

**OXIDATIVER STREß ALS PATHOPHYSIOLOGISCHER
FAKTOR AKTINISCHER DERMATOSEN**

**Beeinträchtigung enzymatischer Antioxidantien und
Anreicherung von Lipidperoxidationsprodukten bei UV-
assoziierten Hauttumoren**

Dissertation

**zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)**

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Florian Peter Hamm
geboren am 11.04.1975 in Weingarten

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Elsner
2. Prof. Dr. med. Kinne
3. Prof. Dr. med. Ochsendorf

Tag der öffentlichen Verteidigung: 10.10.2005

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

CAT	Catalase
SOD	Superoxiddismutase
AK	aktinische Keratose
BCC	Basalzellkarzinom
SCC	spinozelluläres Karzinom
SSM	superfiziell spreitendes Melanom
ANOVA	one-way analysis of variance
NZN	Nävuszellnävus
$\cdot\text{O}_2^-$	Superoxidanionenradikal
$\text{OH}\cdot$	Hydroxylradikal
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
ROS	Reactive Oxygen Species, Reaktive Sauerstoffspezies
MDA	Malondialdehyd
AEC-Reagenz	3-Amino-9-Ethyl-Carbazol Reagenz
PBS	Phosphate buffered saline, Phosphat gepufferte NaCl-Lösung

INHALTSVERZEICHNIS

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. EINLEITUNG	3
2.1. UV-INDUZIERTES CUTANES TUMOREN	3
2.1.1. <i>Epidermale Tumoren</i>	5
2.1.2. <i>Melanozytäre Tumoren</i>	9
2.2. OXIDATIVER STRESS	12
2.2.1. <i>Reaktive Sauerstoffspezies</i>	12
2.2.2. <i>Lipidperoxidation</i>	14
2.2.3. <i>Antioxidative Enzyme</i>	15
3. AUFGABENSTELLUNG UND ZIEL	18
4. MATERIAL UND METHODEN	20
4.1. CHEMIKALIEN	20
4.2. PATIENTENPROBEN	21
4.3. ANTIKÖRPER	27
4.4. GEWEBSPROZESSIERUNG	28
4.5. FÄRBUNG	29
4.6. DIE STREPTAVIDIN-BIOTIN-KOMPLEX METHODE	30
4.7. ARCHIVIERUNG DER HISTOLOGISCHEN PRÄPARATE	31
4.8. AUSWERTUNG	31
4.8.1. <i>Semiquantitative visuelle Auswertung</i>	31
4.8.2. <i>Densitometrische Auswertung</i>	32
4.9. STATISTISCHE ANALYSE	32

5. ERGEBNISSE	33
5.1. MELANOZYTÄRE TUMOREN	33
5.1.1. <i>Expression von Cu/Zn-SOD</i>	33
5.1.2. <i>Expression von Mn-SOD</i>	35
5.1.3. <i>Expression von Catalase</i>	37
5.1.4. <i>Untersuchung auf Malondialdehyd</i>	39
5.2. EPIDERMALE TUMOREN	41
5.2.1. <i>Expression von Cu/Zn-SOD</i>	41
5.2.2. <i>Expression von Mn-SOD</i>	43
5.2.3. <i>Expression von Catalase</i>	45
5.2.4. <i>Untersuchung auf Malondialdehyd</i>	47
6. DISKUSSION	49
6.1. MELANOZYTÄRE TUMOREN	50
6.2. EPIDERMALE TUMOREN	54
7. SCHLUBFOLGERUNG	57
8. LITERATURVERZEICHNIS	60
9. ANHANG	67
9.1. DANKSAGUNG	67
9.2. EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	68
9.3. LEBENSLAUF	69

1. Zusammenfassung

Durch ihre besondere Lokalisation ist die Haut unterschiedlichen oxidativen Einflüssen ausgesetzt. Ultraviolette Strahlung spielt neben der genetischen Disposition eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der meisten Formen von Hautkrebs in kumulativ Sonnenlicht-exponierter Haut. UV-Strahlung ist in der Lage, die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zu induzieren. Dies scheint vor allem durch langwellige UVA-Strahlung zu geschehen, die von DNA-Molekülen nicht mehr oder nur in geringem Maße absorbiert wird (Black et al., 1997).

Sauerstoffradikalen wird inzwischen immer mehr eine Schlüsselrolle bei der Pathogenese von Hautkrebs zugewiesen (Sander et al., 2004).

Die Haut verfügt über verschiedene Mechanismen, um das natürlich vorhandene Gleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien zu wahren und so oxidativen Schäden der Zellen entgegenzuwirken. Die verschiedenen Mechanismen greifen hierbei eng ineinander und bilden so ein antioxidatives Netzwerk (Thiele et al., 2001). UVA- und auch UVB-Strahlung können das antioxidative System der Haut beeinflussen. Als ein weiterer Schlüsselfaktor werden Lipidperoxidaionsprodukte wie Malondialdehyd betrachtet. Diese entstehen sowohl durch UV-Strahlung direkt als auch durch Sauerstoffradikale.

Deshalb wurde die Hypothese formuliert, daß in Hauttumoren das natürliche Redoxgleichgewicht zugunsten oxidativer Bedingungen verschoben ist. Diese Imbalance könnte zu einer Akkumulation von Lipidperoxidaionsprodukten führen und damit Einfluß auf die Photokarzinogenese besitzen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Expression der antioxidativen Enzyme Catalase und Superoxiddismutase (SOD) bei den malignen Melanomen signifikant erhöht ist. Epidermale Tumoren dagegen zeigen eine zum Teil deutlich verringerte Expression von Catalase und Superoxiddismutase. Das Basalzellkarzinom zeigt eine signifikante Verringerung der Aktivität der Catalase. Die Expression der Cu/Zn-SOD ist dagegen nur leicht vermindert. Beim spinozellulären Karzinom dagegen ist die Cu/Zn-SOD stärker vermindert als die Catalase.

Des weiteren weisen maligne Melanome eine signifikante Erhöhung des Lipidperoxidaionsproduktes Malondialdehyd auf. Bei epidermalen Tumoren zeigt nur das spinozelluläre Karzinom eine signifikante Steigerung. Zum ersten Mal konnte somit eine

Korrelation zwischen Malondialdehyd und Melanomen der menschlichen Haut *in vivo* gezeigt werden.

Die Befunde weisen auf eine unterschiedliche Rolle des oxidativen Streß in der Pathogenese von melanozytären und epidermalen Hauttumoren hin.

Die Verminderung der antioxidativen Kapazität epidermaler Tumoren durch chronische UV-Exposition könnte Prozesse der Karzinogenese begünstigen.

Melanomzellen schützen sich möglicherweise in Form einer Aktivierung des enzymatischen antioxidativen Netzwerks vor oxidativen Abwehrmechanismen des Körpers und wirken durch endogene Erzeugung von Radikalen auf verschiedene pathogene Prozesse, wie Tumorprogression oder Metastasierung.

2. Einleitung

2.1. *UV-induzierte cutane Tumoren*

Die Epidermis besteht aus mehrschichtigem verhorntem Plattenepithel. Die Versorgung erfolgt durch Diffusion aus der darunter liegenden gefäßreichen Dermis. Das Stratum corneum ist die äußerste Zellschicht der Epidermis, bestehend aus flachen, fest gepackten, kernlosen Hornzellen. Hauptzelltypen der Epidermis sind die Keratinozyten. Die Melanozyten, deren Dichte individuell und lokalisationsabhängig stark variabel ist, liegen in den basalen Schichten der Epidermis.

Epidermis und Dermis sind miteinander verzapft. Die Dermis erstreckt sich in die Tiefe bis zum subkutanen Fettgewebe. Ihre Hauptkomponenten sind Zellen, zu denen vor allem Fibroblasten gehören, und bindegewebige Fasern..

Die Haut als Schnittstelle zwischen Körper und Umwelt ist einer Vielfalt oxidativer Einflüsse ausgesetzt, darunter ultraviolette Strahlung (UV-Strahlung), Luftschadstoffe und chemische Oxidantien (Thiele et al., 2001). UV-Strahlung spielt neben der genetischen Prädisposition eine wesentliche Rolle in der Pathophysiologie der meisten Hauttumoren. Hautkrebs in verschiedenen Formen zählt zu den häufigsten Neubildungen, bei denen sich weltweit eine deutliche Zunahme feststellen lässt (Blum und Volkenandt, 2002).

Hauttumoren lassen sich anhand ihrer Ursprungszellen in epidermale und melanozytäre Hautveränderungen einteilen. Dabei zeigen sowohl epidermale als auch melanozytäre Tumoren eine steigende Inzidenz (Armstrong und Krickler, 2001; Harris et al., 2001; Diepgen und Mahler, 2002).

Die Inzidenz für epidermale Tumoren wie das Basalzellkarzinom oder spinozelluläre Karzinom stieg in Deutschland von 15 Neuerkrankungen pro 100000 Einwohner zu Beginn der 70er Jahre auf 55-85 Neuerkrankungen pro 100000 Einwohner zu Beginn der 90er Jahre. Damit sind epitheliale Hauttumoren mit ca. 80.000 Neuerkrankungen die zweithäufigste Malignomerkrankung bei beiden Geschlechtern (Blum und Volkenandt, 2002).

Beim malignen Melanom wird ebenfalls von einer weltweiten Zunahme der Neuerkrankungen berichtet. Zu Beginn der 70er Jahre wurden 3 Neuerkrankungen pro 100000 Einwohner festgestellt. In den 90er Jahren registrierte man bereits 12-15 Neuerkrankungen.

In Australien beträgt die Inzidenz für epitheliale Hauttumoren inzwischen über 1% bis 2%. 50 neue Fälle für das maligne Melanom pro 100000 Einwohner werden dort berichtet (Diepgen und Mahler, 2002).

Der Zusammenhang zwischen Dosis, Expositionszeit und Art der Strahlung und deren Bezug zur Entwicklung eines Tumors ist noch nicht eindeutig geklärt (Black et al., 1997). Allerdings werden Zusammenhänge zwischen Art und Dauer der Sonnenexposition und Art des entstehenden Tumors vermutet (Armstrong und Krickler, 2001).

UV-Strahlung beeinflusst die Entstehung von Hauttumoren auf verschiedenen Ebenen. Zum einen können direkt DNA-Schäden verursacht werden, besonders durch Strahlung im Bereich von unter 300 nm (Black et al., 1997). Hierbei können sich Pyrimidindimere bilden (de Gruijl et al., 2001). Diese stehen in Zusammenhang mit Mutationen, zum Beispiel im p53-Suppressorgen. Besonders beim spinozellulären Karzinom und im Basalzellkarzinom konnten am p53-Gen Mutationen von derselben Struktur wie UVB-induzierte Punktmutationen nachgewiesen werden (Kanjilal et al., 1993).

Des weiteren weisen Tumorzellen des Basalzellkarzinoms, des spinozellulären Karzinoms und der aktinischen Keratose einen teilweisen Verlust von Chromosomenfragmenten auf, einen sogenannten „Loss of Heterozygosity“ (LOH) (Quinn et al., 1994). Hier stellt sich die Frage, ob die beobachteten LOHs direkte Folge von UV-Strahlung sein könnten.

Daneben kann UV-Strahlung durch die Generierung von sogenannten reaktiven Sauerstoffspezies in die Karzinogenese eingreifen. Dies scheint vor allem durch langwellige UVA-Strahlung zu geschehen, die von DNA-Molekülen nicht mehr oder nur in geringem Maße absorbiert wird (Black et al., 1997).

Auch der Peroxidation von Lipiden durch UV-Strahlung wird immer mehr eine Schlüsselrolle bei der Karzinogenese zugewiesen (Punnonen et al., 1991b; Marnett, 1999a).

2.1.1. Epidermale Tumoren

Aktinische Keratose (AK):

Die aktinische Keratose ist eine keratotische Veränderung, die besonders auf chronisch lichtgeschädigter Haut auftritt. Prädisloktionsstellen sind somit insbesondere Stirn, Glatze oder Nasenrücken. Betroffen sind hellhäutige, blonde oder rothaarige Menschen mit sonnenempfindlicher Haut.

Die aktinische Keratose ist eine intraepidermal gelegene Präkanzerose, die in ein spinozelluläres Karzinom übergehen kann. Sie entspricht einem *Carcinoma in situ*.

Die Läsion beginnt als kleiner, umschriebener, atrophischer Herd (flache Keratose). Nach Monaten bis Jahren werden diese gelbgrau-bräunlich und bieten eine harte und rauhe Oberfläche. Sie können sich zu hornartigen, dornenähnlichen Läsionen weiterentwickeln (Cornu cutaneum). An der Basis dieser Hauthörner können Tumorzapfen schon die Dermis infiltrieren (siehe Abb.1) (Nguyen und Ho, 2002).

Die Keratosen sind leicht verletzlich, bei Entfernung kann es zu Blutungen kommen.

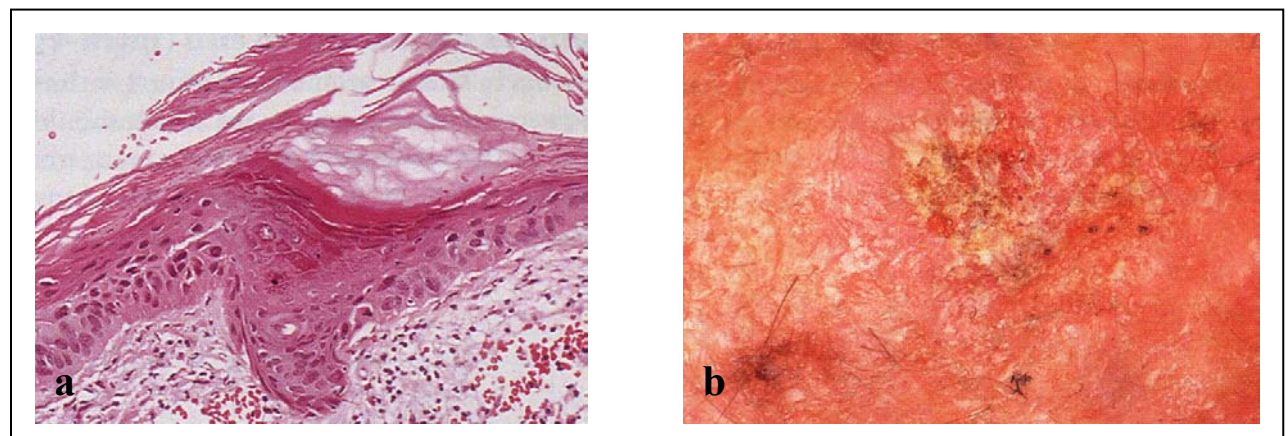


Abb.1: aktinische Keratose

a: polymorphe Zellen mit Hyperchromasie, Hyperkeratose und chronischem Entzündungsinfiltrat

b: unregelmäßig geformte, gelbbraune Hyperkeratose

Nach (Stevens, 1989)

Die wichtigsten histologischen Auffälligkeiten sind epidermale dysplastische Keratinozyten mit vergrößerten Nuclei. Die Zellen sind unregelmäßig in Form sowie in Größe. Die Kerne zeigen einen Hyperchromatismus. Oft läßt sich eine erhöhte Zahl von Mitosen nachweisen. Die Architektur der Epidermis ist gestört. Dabei sind die pleomorphen Zellen mit den hyperchromatischen Kernen vor allem in den basalen Schichten lokalisiert (Cockerell, 2000). Insgesamt scheint die Epidermis nicht verbreitert, es findet sich jedoch eine Verbreiterung des Stratum corneum mit Hyperkeratosen.

Spinozelluläres Karzinom (SCC):

Das spinozelluläre Karzinom oder Plattenepithelkarzinom stellt einen Tumor epidermalen Ursprungs dar. Es tritt fast immer auf vorgeschädigter Haut als Folge von UV-Belastungen auf. Prädispositionsstellen sind somit zum Beispiel Gesicht oder Handrücken. Doch auch andere Noxen wie Tabak- oder Teerexposition können dann vor allem an Zunge oder Unterlippe zum Plattenepithelkarzinom führen. Des weiteren kann es sich auf dem Boden chronisch-entzündlicher Veränderungen bilden (Jung und Moll, 2003).

Klinisch entwickelt sich das SCC aus wenig auffälligen, keratotischen, leicht erhabenen Plaques. Mit zunehmender Entzündungsreaktion in der Umgebung gehen diese in einen exo- und endophytisch wachsenden Tumor über. Das SCC imponiert durch eine derbe Konsistenz oft mit breitharter Infiltration der Unterlage. Die Oberfläche ist unregelmäßig und kann Ulcerationen aufweisen (siehe Abb.2) (Nguyen und Ho, 2002). Der Tumor ist nicht schmerzhaft und weist eine geringe Verletzlichkeit auf. Das Karzinom entsteht fast stets aus aktinischen Keratosen, deshalb finden sich in der Umgebung von spinozellulären Karzinomen meist reichlich aktinische Keratosen oder jüngere Karzinome. Das Wachstum ist relativ langsam und erstreckt sich oft über Monate bis Jahre. Es wächst destruierend, metastasiert lymphogen und hämatogen.

Histologisch weist das SCC eine ungeordnete Epidermisschichtung mit bis in das Korium reichenden Tumorzellsträngen auf. Diese diffus infiltrierenden Zellmassen können in

verschiedenem Grade Differenzierungszeichen behalten haben und sind oft von heftigen zellulären Entzündungsinfiltraten begleitet. Zell- und Kernatypien sind zu finden (Cribier et al., 1999). Die Spinaliomzellen selber sind groß und plasmareich und neigen zur Verhornung. Zum Teil finden sich Hornperlen, die aus konzentrisch aufgebauten Schichten von Spinaliomzellen mit zentraler Verhornung bestehen. Je nach Grad der Entdifferenzierung können die Karzinome auf einer Skala nach Broders unterschieden werden, wie in Tab.1 dargestellt. Grad I stellt einen sehr gut differenzierten und Grad IV einen völlig anaplastisch Tumor dar. Die Malignität des Tumors korreliert mit dessen Differenzierungsgrad (Braun-Falco, 1995).

Tab.1: Differenzierung spinozellulärer Karzinome nach Broders

Grad	Anteil undifferenzierter Zellen
I	<25%
II	<50%
III	<75%
IV	>75%

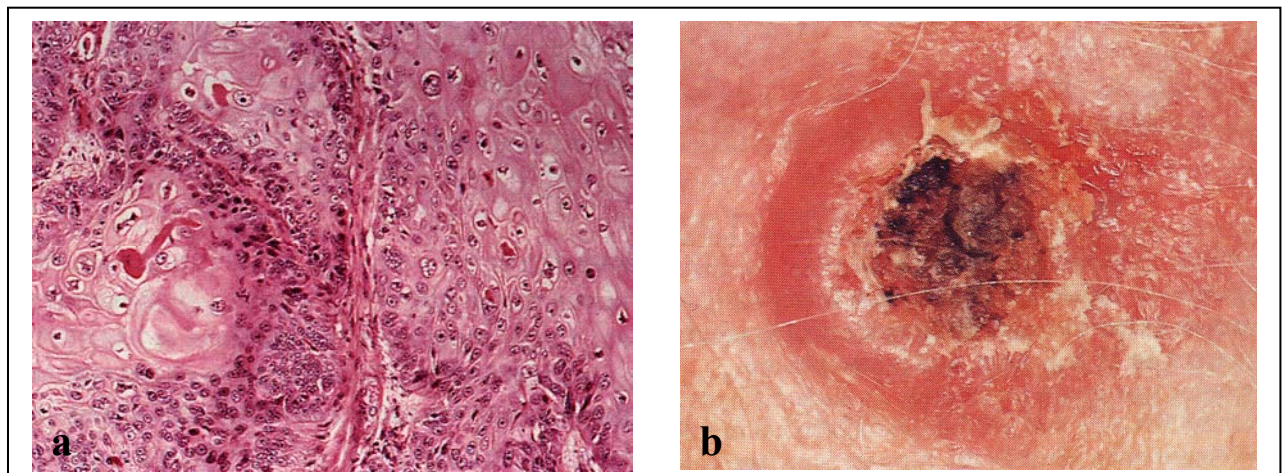


Abb.2: spinozelluläres Karzinom der Haut

a: wenig differenziertes Karzinom mit Kernatypien und Hyperchromasie der Kerne

b: leicht erhabene hyperkeratotische Läsion mit zentralem Ulcus

Nach (Stevens, 1989)

Basalzellkarzinom (BCC):

Das Basalzellkarzinom zählt zu den häufigsten nicht benignen Tumortypen der Haut. Es ist ein von den basalen Zellschichten der Epidermis und dem Follikel ausgehender Tumor, der invasiv und destruierend wächst, jedoch nicht metastasiert. Somit wird er als semimaligne bezeichnet. Als wichtigste Auslöser werden vor allem UV-Strahlung und eine, oft Jahrzehnte zurückliegende, Arsenbelastung angenommen. Prädilektionsstellen sind deshalb vor allem Nase, Präaurikulär- und Orbitaregion, wo sich 80 % aller Basalzellkarzinome finden (Jung und Moll, 2003).

Klinisch stellt sich das BCC als hautfarbenes Knötchen oder Induration mit perlschnurartigem Randwall und Teleangiektasien dar, wie in Abb.3 dargestellt. Ein Basalzellkarzinom besteht aus einem oder mehreren aggregierten derartigen Basaliomknötchen (Miller, 1991).

Histologisch erkennt man von der Basalzellschicht der Epidermis ausgehende solide Zellstränge. Die unterste Zellreihe bildet einen palisadenartigen Wall. Die Basalmembran kann durchbrochen sein. Kernatypien sind eher gering ausgeprägt (Miller, 1991).

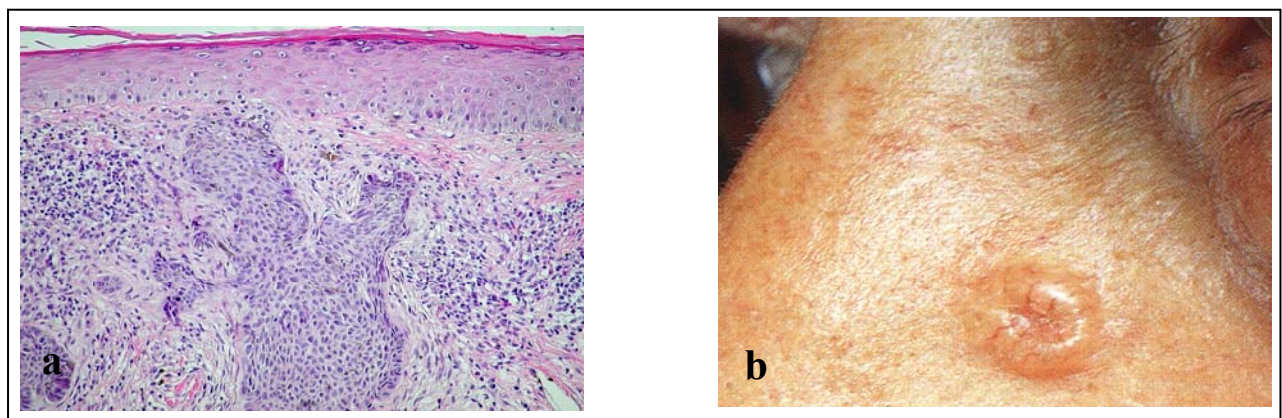


Abb.3: Basalzellkarzinom

a: Solide Tumorzellinseln mit palisadenartiger Stellung der äußersten Zellreihe

b: hautfarbene Knoten mit deutlicher Bildung eines Randwalls und Teleangiektasien

Nach (Stevens, 1989; Bilu, 2003)

2.1.2. Melanozytäre Tumoren

Nävuszellnävi:

Nävi stellen eine gutartige, melanozytäre Veränderung auf dem Boden einer embryonalen Störung dar. Nävuszellnävi sind die häufigste nävogene Fehlbildung der Haut. Bei Geburt sind lediglich die kongenitalen Nävi ausgebildet. Die erworbenen Nävi entwickeln sich erst im Lauf der Kindheit. Nävuszellnester beginnen als kugelige Gebilde in der dermoepidermalen Übergangszone (Junktionszone). Sie entstehen durch fokale Proliferation von Nävuszellen, die eng mit Melanozyten verwandt sind (Jung und Moll, 2003). Diese Zellaggregate können im Lauf der Jahre wachsen und nach unten in die Dermis abtropfen (Compoundnävus). Hier finden sich die Nävuszellnester in der Junktionszone zwischen Dermis und Epidermis und vermehrt im dermalen Bindegewebe, wie in Abb.4 dargestellt.

Ist der Prozeß der Abtropfung abgeschlossen, findet man die Nävuszellnester nur noch in der Dermis (dermaler Nävus) (Crowson et al., 2002).

Nävuszellnävi können punktförmig oder großflächig auftreten. Dabei weisen sie verschiedene Grade der Pigmentierung auf. Oft findet sich eine Hypertrichose. Nävi können Rückbildungstendenzen zeigen und sich zu Fibromen entwickeln. Sie können allerdings auch dysplastische Veränderungen durchmachen, die durch Kernatypien, erhöhte Zahl von Mitosen und vermehrte Pigmentbildung imponieren. Solche Läsionen können Vorläufer der Melanomentwicklung darstellen (Fritsch, 2003).

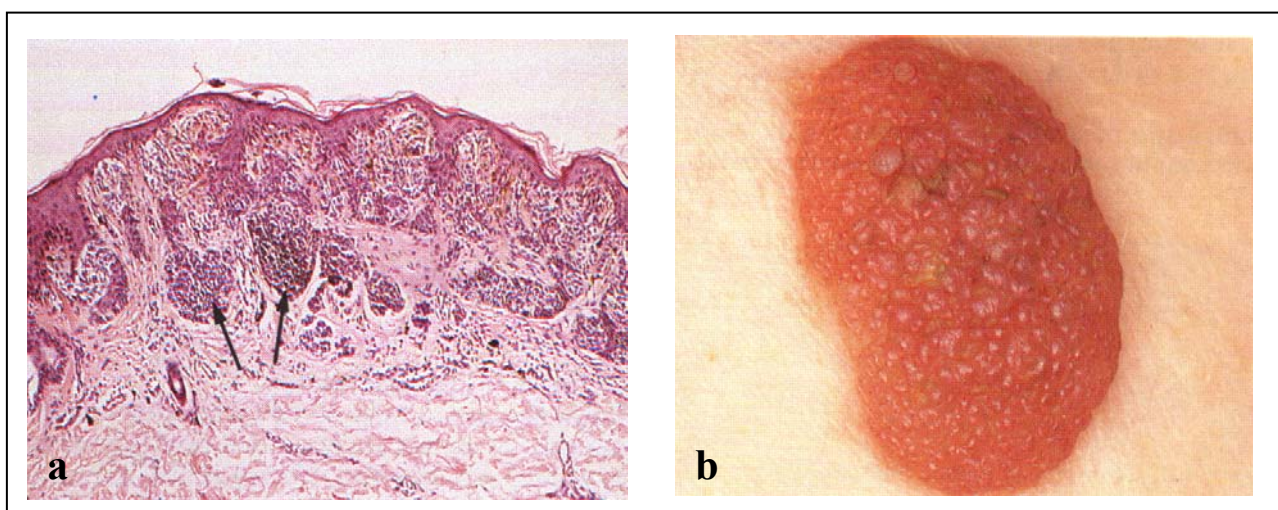


Abb.4: Compoundnävus

a: Nävuszellnester sowohl in der Epidermis wie auch in der Dermis (Pfeile)

b: erhabene deutlich begrenzte Hautveränderung mit papillenartiger Oberfläche

Nach (Stevens, 1989)

Superfiziell Spreitendes Melanom (SSM):

Das maligne Melanom zählt zu den bösartigsten Neubildungen im Bereich der Haut. In den letzten Jahren hat die Inzidenz deutlich zugenommen. Ätiologisch bedeutsam scheint UV-Strahlung, aber auch insbesondere genetische Prädisposition zu sein. Das maligne Melanom tritt meistens zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr auf.

Das superfiziell spreitende Melanom ist durch horizontales Wachstum eines beetartig erhabenen, dunkelbraunen bis schwarzen Herdes gekennzeichnet. Die Begrenzung ist unregelmäßig, aber meist scharf. Auch die Oberfläche und die Farbe des Tumors ist inhomogen (Le et al., 1997). Bei Frauen ist es häufig an den unteren Extremitäten, beim Mann eher am Stamm lokalisiert. Das SSM besitzt eine sehr frühe, oft sehr starke Tendenz zu lymphogener und / oder hämatogener Metastasierung. Die Eindringtiefe des Tumors wird auf einer Skala nach Clark von I – V unterschieden, erklärt in Tab.2. Die Tumordicke wird nach Breslow gemessen (Fritsch, 2003).

Tab.2 : Tumoreindringtiefe des malignen Melanoms nach Clark

Clark-Level	
Eindringtiefe I	Tumorzellen allein in der Epidermis oberhalb der Basalmembran
Eindringtiefe II	Tumorzellen durch die Basalmembran bis in das Stratum papillare
Eindringtiefe III	Tumorzellen bis in die Grenzzone zwischen Stratum papillare und Stratum reticulare
Eindringtiefe IV	Invasion der Tumorzellen zwischen Kollagenfasern im Stratum reticulare
Eindringtiefe V	Invasion der Tumorzellen bis in das subkutane Fettgewebe

Der Tumor geht von den Melanozyten in der Haut aus. Histologisch zeigt das SSM große, zum Teil nur wenig pigmententhaltende atypische Melanozyten, die Tumornester formen (siehe Abb.5). Die Tumorzellen ergeben ein teils über der Basalmembran, teils unter der Basalmembran liegendes Band. Verschiedene Zellstränge wachsen bei Invasivität in die Tiefe (Metcalf, 1996).

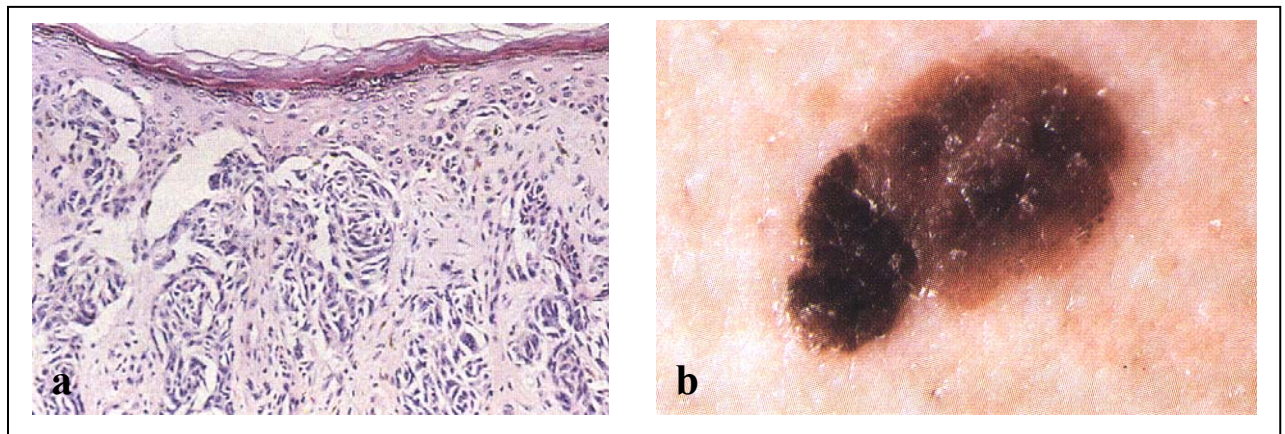


Abb.5: superfiziell spreitendes Melanom

a: Tumorzapfen wachsen in die Tiefe, auch oberhalb der Basalmembran erkennbare Tumornester mit Ausschleusung

b: superfiziell spreitendes Melanom; asymmetrische, scharf begrenzte Hautveränderungen mit Unterschieden in der Pigmentierung

Nach (Stevens, 1989)

Die Diagnose des malignen Melanoms wird durch klinische Untersuchung, Auflichtmikroskopie und Histologie im Rahmen einer großzügigen Exzisionsbiopsie (wenn möglich) gestellt (Kaufmann et al., 1998)

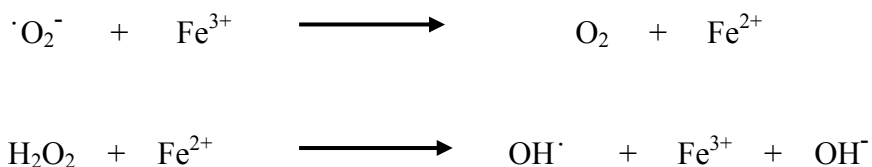
2.2. Oxidativer Streß

2.2.1. Reaktive Sauerstoffspezies

Unter dem Begriff der reaktiven Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species, ROS) werden solche Formen des molekularen und radikalen Sauerstoffs zusammengefaßt, die als hochreaktive Stoffwechselprodukte zur Schädigung von Zellen und Zellverbänden führen können (Toyokuni, 1999). ROS entstehen bei einer Vielzahl von Prozessen im aeroben Metabolismus als Superoxidanionenradikal ($\cdot\text{O}_2^-$), Hydroxylradikal ($\text{OH}\cdot$) und als Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (Slater, 1984). Da zwei Moleküle des Superoxidradikals spontan unter der Bildung von Wasserstoffperoxid miteinander reagieren können, ist die Bildung von Superoxidradikalen immer begleitet von der Entstehung von Wasserstoffperoxid (Perchellet, 1995).

Ein beträchtlicher Schaden entsteht durch die Bildung sekundärer, reaktiverer Radikale. Das Hydroxylradikal ($\text{OH}\cdot$) entsteht in der Haber–Weiss–Reaktion von Wasserstoffperoxid mit dem Superoxidradikal (Fridovich, 1984). In der Gegenwart verschiedener Metalle wird diese Reaktion beschleunigt, wobei das Metall als Katalysator dient. Diese Reaktion wird als Fenton–Reaktion bezeichnet.

Fenton-Reaktion:



Aufgrund seiner extremen Reaktivität kann das Hydroxylradikal direkt mit Strukturen in seiner Nähe reagieren. Damit ist der Schaden durch Wasserstoffperoxid und das Superoxidradikal eng gebunden an die Lokalisation eines Metallions (Fe, Cu oder verschiedene Hämproteine). Da Eisen sich bevorzugt an Anionenmoleküle wie Nukleinsäuren

oder Phospholipidmembranen lagert anstatt frei in Lösung vorzuliegen, entsteht das Radikal in der Nachbarschaft wichtiger Strukturen und kann sie damit selektiv schädigen (Fridovich, 1998).

Radikale Sauerstoffspezies entstehen endogen an mehreren Orten. In der mitochondrialen Atmungskette kann es zu Lücken im Elektronentransport kommen, die zur Bildung von Superoxidradikalen führen (Sies, 1997). Eine zweite Quelle stellen die Peroxisomen dar. Hier entsteht beispielsweise bei der Metabolisierung von Fremdstoffen Wasserstoffperoxid als Nebenprodukt. Peroxisomen besitzen eine hohe Konzentration an Catalase, um dieses zu entgiften. Dabei scheint während schneller Zellproliferation das Vorkommen oxidativer Metaboliten verstärkt zu sein (Ockner et al., 1993; Arnaiz et al., 1995). Cytochrom p-450 Enzyme, die an vielen Reaktionen des Körpers beteiligt sind, können ROS freisetzen. Einige der Cytochrom-Isoenzyme bewirken dies direkt (Koop, 1992). Ein alternativer Weg involviert zyklische Redoxreaktionen (Halliwell, 1989). Phagozytierende Zellen sind in der Lage, hohe Konzentrationen von ROS zu produzieren. Dabei zeigen sie nach Stimulation eine gesteigerte O₂-Aufnahme und ROS-Produktion. Dies wird vermittelt durch eine membranständige NADP-Oxidase. Das Phänomen ist bekannt als „respiratory burst“.

Reaktive Sauerstoffspezies erfüllen vielfältige Funktionen im Körper. Beim „respiratory burst“ dienen sie der Abwehr von Pathogenen. Des Weiteren besitzen Sauerstoffradikale Anteil an Signaltransduktionsprozessen, wie beispielsweise der Apoptose (Zamzami et al., 1997; Chang et al., 2003) oder Zellproliferationsvorgängen (Burdon und Rice-Evans, 1989). Die Aktivierung verschiedener Kinasen, wie Proteinkinase C, MAP-Kinase, oder Rezeptor-Tyrosinkinasen zeigt eine Abhängigkeit von ROS (Klann et al., 1998; Abe et al., 2000). Verschiedene Transkriptionsfaktoren wie AP-1 oder NF-κB stehen ebenfalls unter dem Einfluß des intrazellulären Verhältnisses von Oxidation zu Reduktion (Meyer et al., 1994; Gius et al., 1999).

Doch auch direkte Schädigung zellulärer Bestandteile ist bekannt. Hierbei sind die Schädigung von Strukturen der DNA und der Einfluß auf karzinogene Prozesse von entscheidender Bedeutung. Zum einen können Sauerstoffradikale Lipide oder Proteine oxidieren, was zur Bildung von reaktiven Metaboliten führt. Diese sind in der Lage, auf verschiedene Art und Weise DNA-Schädigungen hervorzurufen (Marnett, 2000). ROS sind aber auch in der Lage direkt DNA-Basen oder Desoxyribosereste anzugreifen. Einzel- oder Doppel-Strangbrüche können die Folge sein, entweder direkt oder bei folgenden Reparaturvorgängen durch Endonucleasen (Breen und Murphy, 1995; Perchellet, 1995). Der Einbau fehlerhafter Basen kann mutagene Effekte haben (Loft und Poulsen, 1996; Olinski et

al., 1998). Sind kritische Genabschnitte, wie z.B. Protooncogene oder Tumor-Suppressorgene betroffen, kann eine Tumorinitiation die Folge sein (Cerutti et al., 1992; Ames et al., 1995).

ROS sind an vielen Prozessen der Karzinogenese beteiligt sind. Wesentliche Faktoren dafür sind nicht nur direkte DNA-Schädigung sondern auch ihre Wirkung als Signaltransmitter (Borek, 1991; Burdon, 1995).

2.2.2. Lipidperoxidation

Neben der Entstehung von ROS bewirkt UV-Strahlung auch eine Peroxidation von Lipiden (Thiele et al., 1998; Girotti, 2001; Ekanayake Mudiyanse et al., 2003). In der Pathogenese von Hautkrankheiten spielt die Lipidperoxidation eine wichtige Rolle, da die Haut eine besonders hohe Konzentration von ungesättigten Fettsäuren in der Membranschicht enthält.

Die Radikalkettenprozesse, in denen Lipidperoxidationsprodukte entstehen, laufen ähnlich ab wie bei den radikalischen Sauerstoffspezies. Angestoßen werden können diese Prozesse wie alle Radikalketten-Prozesse durch andere Radikale, zum Beispiel ROS. Dadurch kann ein einzelnes Radikal viele Moleküle von Fettsäuren oxidieren, wie in Abb.6 dargestellt (Marnett, 1999a).

Aldehyde, die während der Lipidperoxidation entstehen, sind beteiligt an der Pathophysiologie von verschiedenen Prozessen, die mit oxidativem Stress assoziiert sind. Dabei besteht ein wesentlicher Unterschied zu den Sauerstoffradikalen in der relativen Langlebigkeit. So können sie vom Ort der Entstehung zu extra- oder intrazellulären Zielen diffundieren und als "second toxic messengers" der komplexen Kettenreaktion agieren, in denen ungesättigte Fettsäuren der Membrandoppelschicht oxidiert werden (Esterbauer et al., 1991).

Bei dem in dieser Arbeit untersuchten Lipidperoxidationsprodukt handelt es sich um Malondialdehyd (MDA). MDA ist ein natürlich vorkommendes Produkt der Lipidperoxidation und des Prostaglandin-Stoffwechsels. Es scheint das größte mutagene Potential verschiedener Lipidperoxidationsprodukte zu besitzen (Marnett, 1999b).

MDA reagiert u.a. mit Basen von Nukleinsäuren unter der Bildung verschiedener sogenannter DNA-Addukte. Dabei entstehen Pyrimidopurinone. Unter ihnen scheint dem M₁G die wichtigste Rolle zuzukommen. Dieses und auch andere entstehende DNA-Addukte bewirken verschiedene Veränderungen des genetischen Codes. Zu den häufigsten Veränderungen zählt

die Basenpaar-Substitution. Dabei überwiegen Transversionen, vor allem $G \rightarrow T$. Transitionen folgen, hier ausschließlich $C \rightarrow T$ und $A \rightarrow G$. Auch sogenannte "frameshift mutations" wurden in Versuchen mit *E. coli* festgestellt (Marnett, 1999b).

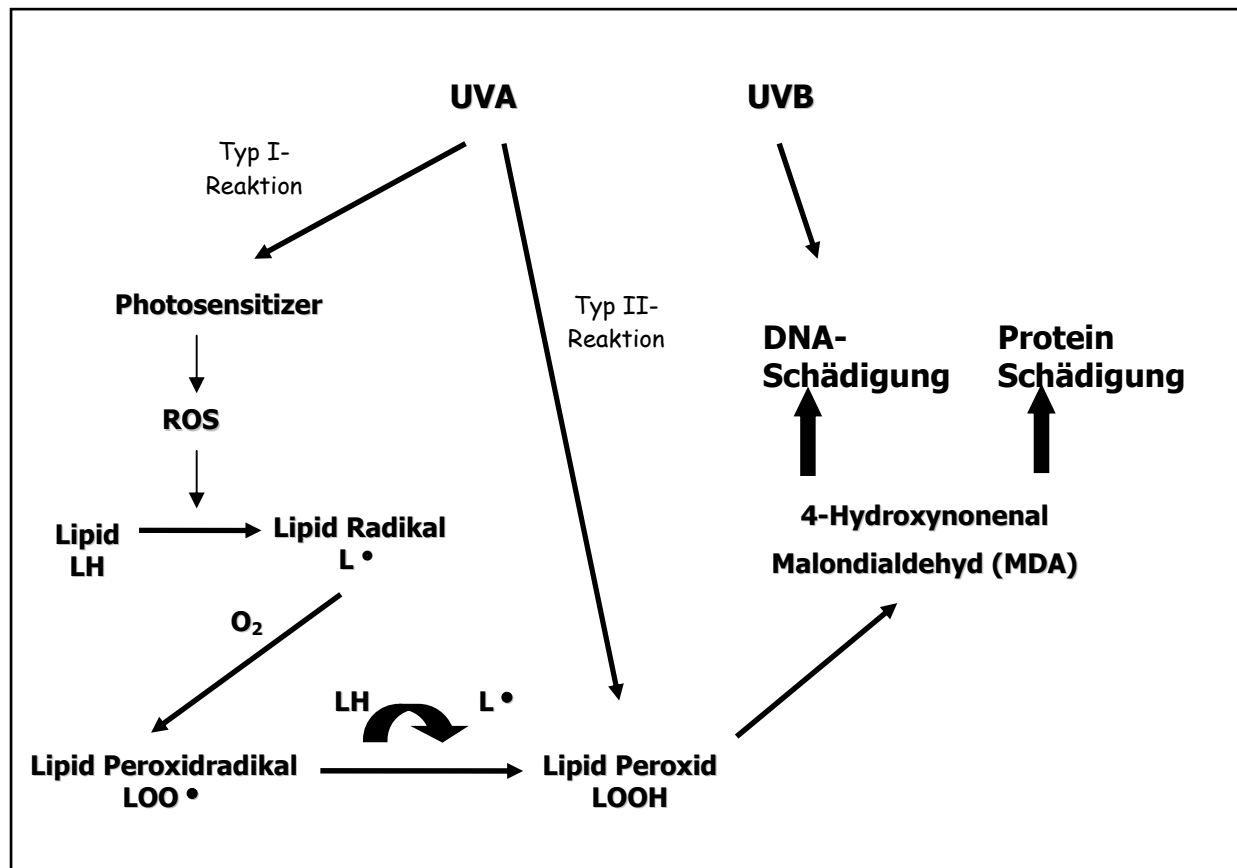


Abb.6: Auswirkung von UV-Strahlung auf die Oxidation von Lipiden und die Schädigung der DNA durch Lipidperoxydationsprodukte

2.2.3. Antioxidative Enzyme

Oxidativer Streß, das heißt die Auslenkung des natürlichen Redoxgleichgewichtes zugunsten oxidativer Bedingungen, besitzt wahrscheinlich eine wesentliche Bedeutung bei der Entstehung und Progression von UV-induzierten Hauttumoren. Die Haut verfügt über verschiedene Mechanismen, um oxidativen Streß abzuwehren. Diese sind notwendig, um das natürlich vorhandene Gleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien zu wahren.

Die verschiedenen Mechanismen greifen hierbei eng ineinander und bilden ein antioxidatives Netzwerk (Weber et al., 1999). Das antioxidative System schützt die Haut vor einer Auslenkung des natürlichen Redoxgleichgewichtes und Zellen vor überschüssender Konzentration von radikalischen Sauerstoffspezies.

Als Teil des Schutzsystems fungieren Vitamin E, Glutathion und auch Vitamin C. Doch auch verschiedene Enzyme wirken mit in diesem Gefüge (Fuchs et al., 1989; Thiele et al., 2001).

Catalase und Superoxiddismutase sind wichtige Enzyme im antioxidativen Netzwerk.

2.2.3.1 Superoxiddismutase (SOD)

Die Superoxiddismutase katalysiert die Reaktion des Superoxidradikals, $\cdot\text{O}_2^-$ zu Wasserstoffperoxid, H_2O_2 .



Eine zweite Funktion der Superoxiddismutase besteht im Schutz anderer Enzyme, wie beispielsweise der 6-Phosphogluconat-Dehydratase gegen das inaktivierende freie Superoxidradikal (Mates et al., 1999).

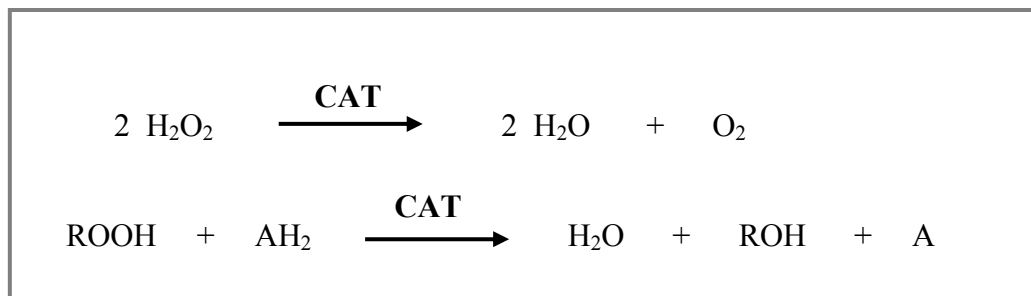
Es sind verschiedene Formen der Superoxiddismutase beschrieben worden. Die Cu/Zn-SOD ist ein dimeres Enzym bestehend aus zwei identischen Untereinheiten mit je einem Kupfer- und einem Zink-Atom. Sie ist im Zytosol der Zelle lokalisiert. Das Enzym arbeitet mit einer sehr hohen Reaktionsgeschwindigkeit, fast nur begrenzt durch die Diffusionsgeschwindigkeit (Fridovich, 1998).

Die manganabhängige SOD ist eine weitere Form der Superoxiddismutase. Es ist ein tetrameres Molekül mit je einem Mangan-Atom pro Untereinheit und ist im Gegensatz zur Cu/Zn-SOD im Mitochondrium lokalisiert. Gerade die Expression der Mn-SOD scheint durch vielfältige Faktoren beeinflussbar zu sein. Sowohl IL-1 als auch TNF- α bewirken einen deutlichen Anstieg der Expression von Mn-SOD, nicht aber von Cu/Zn-SOD mRNA in pulmonalen Epithelzellen der Ratte (Visner et al., 1990).

2.2.3.2 Catalase (CAT)

Die Catalase als eines der effizientesten Enzyme (Cerutti et al., 1994) des Körpers entgiftet das beim „respiratory burst“ und nach Reaktion mit SOD anfallende Wasserstoffperoxid unter der Bildung von Wasser und Sauerstoff. Die Catalase ist ein tetrameres Enzym. Jede Untereinheit enthält im aktiven Zentrum eine Häm-Gruppe.

Auch H-Donatoren und Peroxiden kann sie entgegen wirken.



Eine essentielle Rolle für die Zelle scheint sie bei der Adaption auf oxidativen Streß zu spielen (Hunt et al., 1998).

Deutlich ersichtlich ist, daß die Reaktionswege der CAT und der SOD ineinander übergreifen. Damit eine einwandfreie Verknüpfung ermöglicht wird, sind „matched activities“ der beiden Enzyme notwendig, um eine effektive Neutralisation von Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid zu gewährleisten (Yohn et al., 1991).

3. Aufgabenstellung und Ziel

UV-Strahlung ist ein wichtiger Faktor in der Ätiologie von melanozytären und epidermalen Tumoren. Der von ihr und anderen Faktoren produzierte oxidative Streß hat Anteil an einer Reihe von pathophysiologischen Prozessen wie DNA-Schädigung oder Lipidperoxidation, die unter anderem als Schlüsselfaktor für die Entstehung von Hauttumoren angesehen werden.

In bestimmten Hauttumoren scheint das natürliche Redoxgleichgewicht zugunsten oxidativer Bedingungen verschoben. Diese Dysbalance könnte zu einer Akkumulation von Lipidperoxidationsprodukten führen, unter denen dem Malondialdehyd aufgrund seines hohen mutagenen Potentials wahrscheinlich eine Schlüsselrolle zukommt.

Es liegen zahlreiche Studien vor, die einen Zusammenhang zwischen oxidativem Streß, UV-induzierter Entzündung und Karzinogenese der Haut nahelegen. Die meisten dieser Studien haben jedoch einen zell- und tierexperimentellen Ansatz (Amstad et al., 1991; Kitazawa et al., 1997; Vural et al., 1999).

Sander et al. zeigten erst kürzlich eine Verminderung der Expression antioxidativer Enzyme bei chronischer UV-Schädigung der menschlichen Haut sowie einen Anstieg der oxidativen Proteinschädigung (Sander et al., 2002).

Dennoch ist der Einfluß von reaktiven Sauerstoffspezies auf die Tumorentwicklung menschlicher Hauttumoren bisher weitgehend ungeklärt.

Auch gibt es keine systematischen Untersuchungen über einen Zusammenhang der Beeinträchtigung enzymatischer Antioxidantien und der Anreicherung von Lipidperoxidationsprodukten bei humanen Hauttumoren.

In der vorliegenden Arbeit sollten verschiedene Hautumoren *ex vivo* untersucht werden. Unter Zuhilfenahme immunhistochemischer Arbeitstechniken sollten Änderungen des Redoxgleichgewichtes von Tumorzellen dargestellt werden. Dabei war ein Schwerpunkt die Untersuchung der antioxidativen Enzyme Superoxiddismutase und Catalase. Es sollte herausgefunden werden, ob und wie stark eine Veränderung des enzymatischen Netzwerks als Schutz gegen oxidativen Streß zu finden ist. Die dabei untersuchten Enzyme greifen ineinander und bilden somit eine Kette antioxidativer Funktionen.

Der zweite Schwerpunkt lag auf der Untersuchung des Lipidperoxidationsmarkers Malondialdehyd. Über die Rolle der Oxidation von Lipiden in der Karzinogenese von Hauttumoren ist bisher wenig bekannt. Dabei kann angenommen werden, daß ihr, besonders im Hinblick auf die Reichhaltigkeit der Haut an ungesättigten Fettsäuren, eine besondere

Rolle zukommt. Die Untersuchungen wurden an Paraffinschnitten von Tumorproben verschiedener menschlicher Hauttumoren durchgeführt.

Ziel der Arbeit war es, festzustellen, inwieweit eine Störung des natürlichen Gleichgewichtes antioxidativer Enzyme bei menschlichen UV-induzierten Hauttumoren besteht. Auch interessierte die Frage, ob anhand der beschriebenen Marker Aussagen über die Beteiligung von oxidativem Streß an der Tumorentstehung oder Progression getroffen werden können. Besonderes Augenmerk galt der Frage nach einer Korrelation zwischen antioxidativem Status, Lipidperoxidation und Tumorgenese.

4. Material und Methoden

4.1. Chemikalien

Acetat-Puffer	TissueGnost®, Fa. Merck, Darmstadt
AEC-Reagenz	TissueGnost®, Fa. Merck, Darmstadt
Anti-Human-Catalase Antikörper (rabbit)	Prof. Dr. A. Voelkl, Institut für Anatomie, Universität Heidelberg
Anti-Human-Cu/Zn-SOD Antikörper (sheep)	Fa. Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden
Anti-Human-Mn-SOD Antikörper (sheep)	Fa. Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden
Anti-MDA Antikörper (rabbit)	Fa. BioTrend, Köln
Aquatex Eindeckmedium	TissueGnost®, Fa. Merck, Darmstadt
Biotinylierte-Peroxidase – Konzentrat	TissueGnost®, Fa. Merck, Darmstadt
Ethanol 96 %	Fa. Roth, Karlsruhe
Hämatoxylin-Lösung	TissueGnost®, Fa. Merck, Darmstadt
PBS	Fa. Euroimmun, Lübeck
Proteinblockierreagenz	TissueGnost®, Fa. Merck, Darmstadt
Sekundärantikörperreagenz	TissueGnost®, Fa. Merck, Darmstadt
Streptavidin-Konzentrat	TissueGnost®, Fa. Merck, Darmstadt
Waschpufferkonzentrat	TissueGnost®, Fa. Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid 30%	Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Xylol	Fa. Roth, Karlsruhe

4.2. Patientenproben

In dieser Arbeit wurden Gewebeproben von Patienten mit aktinischer Keratose (AK), Basalzellkarzinom (BCC), spinozellulärem Karzinom (SCC), superfiziell spreitendem Melanom (SSM) und benignen Nävuszellnävi (NZN) untersucht. Es wurden Paraffinschnitte angefertigt von Hautveränderungen, die an der Klinik für Dermatologie der Friedrich-Schiller-Universität entnommen worden waren und in einer Gewebedatenbank archiviert waren. Junge Kontrollhaut wurde gewonnen aus der Umgebungshaut benigner NZN, die entfernt wurde, um spannungsfreie Narben zu erzielen.

Ein positives Votum der Ethikkommission der FSU Jena lag vor Beginn der Studie vor.

Das Gewebematerial von Patienten mit SSM wurde verglichen mit Proben von altersentsprechenden Patienten mit NZN und mit junger, gesunder Kontrollhaut. Die epidermalen Tumore BCC und SCC wurden verglichen sowohl mit der Präkanzerose AK als auch mit junger, gesunder Kontrollhaut. Zusätzlich wurde bei jedem Tumor ein Vergleich mit seiner Umgebungshaut durchgeführt. In Tab.3 bis Tab.8 sind die Daten der einzelnen Patientengruppen dargestellt.

Tab.3 : Zusammenfassung der Patientendaten der Kontrollgruppe „junge, gesunde Haut“

Nr	Geschlecht	Alter (Jahre)	Lokalisation
1	m	20	Rücken
2	m	22	untere Extremität
3	m	16	Rücken
4	m	11	Rücken
5	w	13	Rücken
6	w	17	Rücken
7	w	31	Rücken
8	w	5	Gesicht
9	m	22	Rücken
10	m	15	untere Extremität
n = 10	m = 6 w = 4	MW = 17,2 SD = 7,1	Rücken = 7 untere Extremität = 2 Gesicht = 1

Tab.4 : Zusammenfassung der Patientendaten der Gruppe „NZN“

Nr	Geschlecht	Alter (Jahre)	Lokalisation	Congenital (cg) / Erworben (e)	Compound(cp) / Intradermal (i)
1	m	39	Rücken	e	cp
2	w	55	Rücken	e	i
3	m	39	obere Extremität	e	i
4	m	40	Rücken	e	cp
5	w	70	Gesicht	e	i
6	w	58	Bauch	e	cp
7	m	49	Rücken	e	cp
8	m	41	Rücken	e	i
9	w	41	Gesicht	e	i
10	w	43	Bauch	e	i
11	w	62	Rücken	e	i
12	w	46	Rücken	e	cp
13	m	55	Rücken	cg	cp
14	w	57	Rücken	e	cp
15	w	53	Bauch	e	i
16	m	36	Rücken	e	cp
17	w	57	Rücken	e	cp
18	m	37	Gesicht	e	i

n = 18	m = 8	MW = 48,8	Rücken = 11	cg = 1	cp = 9
	w = 10	SD = 9,9	Gesicht = 3	e = 17	i = 9
			obere Extremität = 1		
			Bauch = 3		

Tab.5 : Zusammenfassung der Patientendaten der Gruppe „SSM“

Nr	Geschlecht	Alter (Jahre)	Lokalisation	Clark-Level	Breslow- Index
1	m	56	Rücken	III	0,8
2	w	79	Gesäß	III	1,9
3	w	47	Rücken	III	2
4	m	39	obere Extremität	III	0,9
5	w	83	untere Extremität	II	1
6	w	61	obere Extremität	II	0,6
7	m	68	obere Extremität	II	0,5
8	m	61	obere Extremität	III	2,7
9	m	64	Bauch	II	0,9
10	m	70	obere Extremität	II - III	0,6
11	m	61	Bauch	III	0,9
12	m	60	Bauch	III	1,6
13	m	20	Gesicht	II - III	1,8
14	m	37	untere Extremität	II	0,7
15	w	35	untere Extremität	III	1
16	w	58	obere Extremität	II	1
17	m	48	Rücken	III	1,6
18	w	93	untere Extremität	IV	1,6

n = 18 m = 11 MW = 57,8 Rücken = 3 MW Clark-Level = II - III
 w = 7 SD = 18,2 Gesäß = 1 MW Breslow-Index = 1,2
 obere Extremität = 6
 untere Extremität = 4
 Gesicht = 1
 Bauch = 3

Tab.6 : Zusammenfassung der Patientendaten der Gruppe „BCC“

Nr	Geschlecht (Jahre)	Alter	Lokalisation
1	w	71	Gesicht
2	w	87	Gesicht
3	m	68	Gesicht
4	m	87	Rücken
5	w	71	Brust
6	m	59	Gesicht
7	m	83	Rücken
8	m	52	Gesicht
9	m	67	untere Extremität
10	m	82	Rücken
11	m	60	Gesicht
12	m	59	Rücken
13	m	65	Rücken
14	m	63	Gesicht
15	w	82	Gesicht
16	m	73	Gesicht
17	m	71	Rücken
18	w	40	obere Extremität
n = 18	m = 13 w = 5	MW = 68,9 SD = 12,6	Gesicht = 9 Rücken = 6 Brust = 1 untere Extremität = 1 obere Extremität = 1

Tab.7 : Zusammenfassung der Patientendaten der Gruppe „AK“

Nr	Geschlecht	Alter (Jahre)	Lokalisation
1	m	68	Gesicht
2	w	82	obere Extremität
3	m	74	Gesicht
4	m	57	Rücken
5	m	85	Gesicht
6	m	59	Gesicht
7	m	72	Gesicht
8	m	60	Gesicht
9	w	75	obere Extremität
10	m	67	Gesicht
11	m	67	Gesicht
12	m	79	untere Extremität
13	m	58	Gesicht
14	w	90	Gesicht
15	m	62	Gesicht
16	m	66	Rücken
17	w	74	Gesicht
18	m	65	Gesicht

n = 18	m = 14	MW = 70,0	Gesicht = 13
	w = 4	SD = 9,6	obere Extremität = 2
			Rücken = 2
			untere Extremität = 1

Tab.8 : Zusammenfassung der Patientendaten zur Gruppe „SCC“

Nr	Geschlecht	Alter (Jahre)	Lokalisation	Broders
1	m	73	untere Extremität	I - II
2	w	71	untere Extremität	I - II
3	m	60	untere Extremität	I
4	w	59	Gesicht	I
5	m	81	Gesicht	II
6	m	51	untere Extremität	unbekannt
7	w	48	Brust	unbekannt
8	w	71	Bauch	I - II
9	m	51	untere Extremität	I - II
10	m	62	unbekannt	II - III
11	m	90	Gesicht	I
12	m	65	Gesicht	unbekannt
13	w	73	untere Extremität	II
14	m	71	Gesicht	unbekannt
15	w	79	untere Extremität	II
16	w	91	Gesicht	II - III
17	m	76	untere Extremität	III
18	m	76	unbekannt	II - III
n = 18	m = 11 w = 7	MW = 70,0 SD = 9,6	Gesicht = 6 untere Extremität = 8 Brust = 1 Bauch = 1 unbekannt = 2	Broders I = 3 Broders I – II = 4 Broders II = 3 Broders II – III = 3 Broders III = 1 unbekannt = 4

4.3. Antikörper

Tab.9 : Eigenschaften der verwendeten Antikörper

Spezifität	Spezies	Verdünnung	Firma
Superoxiddismutase (Cu/Zn)	Schaf	1 : 500	Fa. Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden
Superoxiddismutase (Mn)	Schaf	1 : 250	Fa. Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden
Catalase	Kaninchen	1 : 500	zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Voelkl, Institut für Anatomie, Universität Heidelberg
Malondialdehyd	Kaninchen	1 : 1000	Fa. BioTrend, Köln

Die verwendeten Antikörper wurden mit 1 %-Serum eines Spenders der Blutgruppe AB im histologischen Labor der Universitätshautklinik Jena verdünnt.

4.4. Gewebsprozessierung

Die Behandlung der Präparate erfolgte in mehreren standardisierten Schritten wie folgt:

1. Nach Entgegennahme aus dem OP wurde das Präparat in Biopsieeinbettkassetten eingebracht. Das Gewebe wurde in einem Einbettautomaten (Histokinette, Fa. Ventana, Straßburg) entwässert und in Paraffin überführt. Hierzu durchlief das Präparat über Nacht eine Reihe von Bädern immer lipophilerer und konzentrierterer Aldehyde und Alkohole, dargestellt in Tab.10.

Tab.10 : Protokoll einer „Über-Nacht“-Einbettung

Zeit	Reagens	Temperatur	Vakuum/Druck
1 h	4% Formalin	40°C	
0,30 h	4% Formalin	40°C	Vakuum/Druck
0,45 h	70% Ethanol	40°C	Vakuum/Druck
0,45 h	96% Ethanol	40°C	Vakuum/Druck
0,45 h	100% Isopropylalkohol	40°C	Vakuum/Druck
0,45 h	100% Isopropylalkohol	40°C	Vakuum/Druck
0,45 h	100% Isopropylalkohol	40°C	Vakuum/Druck
0,45 h	Xylol	40°C	Vakuum/Druck
0,45 h	Xylol	40°C	Vakuum/Druck
1 h	Xylol	40°C	Vakuum/Druck
1,3 h	Paraffin	60°C	Vakuum/Druck
1,3 h	Paraffin	60°C	Vakuum/Druck
2 h	Paraffin	60°C	Vakuum/Druck

2. Anschließend wurden die Präparate dem Einbettautomaten entnommen und auf einem Plastischälchen mit flüssigem Paraffin übergossen (60°C, Histoseck, Fa. Merck, Darmstadt).

Von den in Paraffin eingebetteten Gewebeproben wurde mit einem Mikrotom (Fa. Leica, Solms) 4µm dünne Schnitte angefertigt, die auf Objektträger aufgebracht und bei 37°C über Nacht im Brutschrank getrocknet wurden.

4.5. Färbung

Die Vorbehandlung der Schnitte vor dem Färbeprozess erfolgte in mehreren Schritten.

- Entparaffinisierung: Hierzu wurden die Objektträger zunächst 10 min und anschließend erneut 5 min in Xylol-Lösung getaucht. Es folgte eine Behandlung von 10 min mit Ethanol/Blockierreagenz (290 ml Ethanol 96% + 10 ml Wasserstoffperoxid 30%), um endogene Peroxidasen zu blockieren. Danach wurden die Präparate 5 min in Ethanol 96 % getaucht. Es folgte abschließend das Waschen in Leitungswasser für 5 min.
- Blockierung: Um Bindung an freie Reaktionsstellen zu vermeiden, folgte die Inkubation mit Proteinblockierreagenz für 20 min.
- Primärantikörperinkubation: Hier erfolgte das Überschichten der Schnitte mit dem jeweiligen Primärantikörper. Anschließend wurden die Präparate in der feuchten Kammer (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen) bei 37°C für 1h inkubiert.
- Sekundärantikörper und Färbung: Dieser Schritt erfolgte automatisiert mit dem Färbegerät Midas, Fa. Merck, Darmstadt. Die Präparate wurden erst 7 min in Leitungswasser dann 2 min in Waschpuffer (15 ml Waschpufferkonzentrat + 285 ml Aqua dest.) gewaschen. Nun wurden die Schnitte 60 min mit Sekundärantikörper inkubiert. Es folgte das Waschen in Leitungswasser für 5 min und anschließend in Waschpuffer für 2 min. Die Präparate wurden nun 30 min mit ABC-Komplex behandelt. Hierzu wurden 3 ml Streptavidinkonzentrat mit 3 ml biotinylierter Peroxidase gemischt und diese Lösung dann 15 – 30 min zum Reagieren stehen gelassen. Anschließend wurde die Lösung in 300 ml Waschpuffer gegeben. Nach dem Waschen für 5 min wurden die Objektträger 30 min mit der Chromogen-Lösung (AEC) inkubiert und erneut 5 min gewaschen. Abschließend erfolgte für einige Sekunden die Gegenfärbung mit Hämatoxylin.
- Eindecken: Zum Eindecken der Präparate wurde Aquatex verwendet.

Es wurden zur Beurteilung der unspezifischen Färbung des Färbekits und der Bindung des sekundären Antikörpers an nicht antigentrage Strukturen Kontrollschnitte mitgeführt. Dabei wurden mehrere Schnitte von allen untersuchten Tumoren statt mit Primärantikörper mit 1 %-Serum der Blutgruppe AB inkubiert. Dieses diente der späteren Eichung des densitometrischen Messsystems.

4.6. Die Streptavidin–Biotin–Komplex Methode

Das hier verwendete Verfahren des TissueGnost Uni–Pak ABC beruht auf dem Prinzip des Streptavidin–Biotin–Komplexes aus Streptavidin und biotinylierter Peroxidase, dargestellt in Abb.7. Es handelt sich dabei um eine 3–Stufen–Sandwich–Technik. Zunächst wird das entparaffinisierte Präparat mit einem Primärantikörper markiert. An diesen bindet der mit Biotin markierte polyvalente Sekundärantikörper.

An den Biotin–Anteil des Sekundärantikörpers wird das Markermolekül in Form eines präformierten Komplexes aus Streptavidin und biotinylierter Peroxidase gebunden. Nach Zugabe eines Chromogen–Substrates entsteht ein farbiges Reaktionsprodukt. Das benutzte Chromogen–Substrat ist hier 3–Amino–9–Ethyl–Carbazol (AEC).

Zur Herstellung werden 24 Tropfen AEC–Reagenz mit 24 Tropfen Acetatpuffer versetzt und in 300 ml Aqua dest. eingerührt. Nun werden 15 µl H₂O₂ 30% zugegeben.

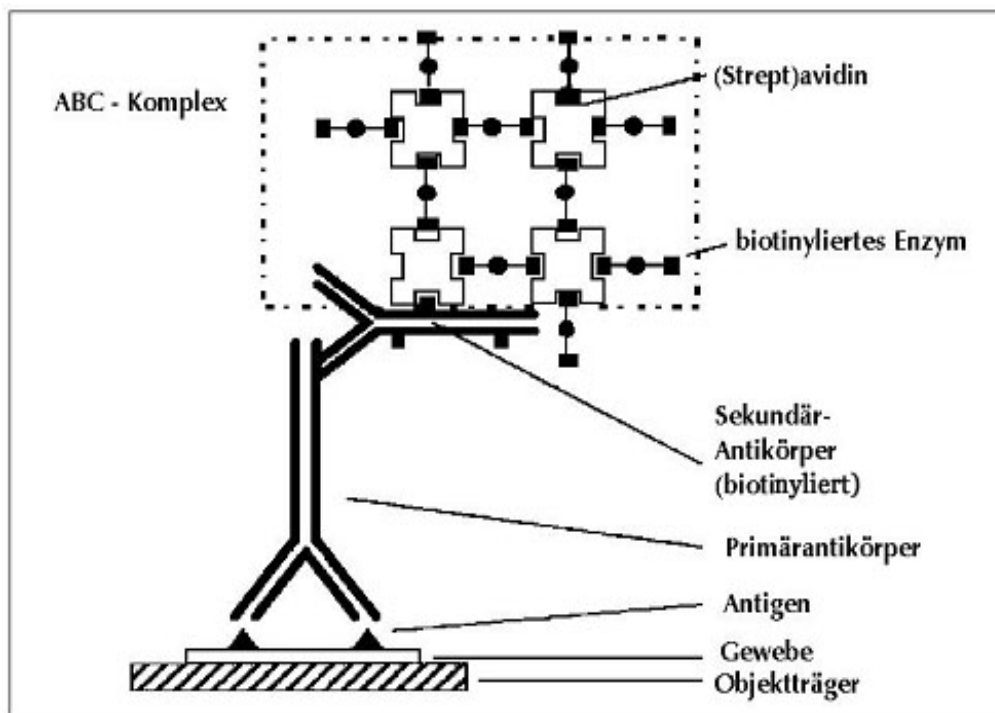


Abb.7: Prinzip der Streptavidin-Biotin-Komplex Methode

4.7. Archivierung der histologischen Präparate

Zur Betrachtung der Präparate kam das Olympus®-System-Mikroskop, Modell BX 40, zur Anwendung. Es wurde hier eine 200 x Vergrößerung zur Betrachtung des Tumors gewählt, sowie eine 400 x Vergrößerung für die Umgebungshaut des Tumors.

Die histologischen Schnitte wurden mit einer Digitalkamera der Firma Olympus, Marke Camedia Digital Camera C-3030 Zoom, fotografiert und mit Hilfe des Programms Analysis 3.1 Software®, Soft Imaging System GmbH, Münster archiviert.

4.8. Auswertung

4.8.1. Semiquantitative visuelle Auswertung

Es wurde zunächst eine semiquantitative visuelle Auswertung der Färbungen durchgeführt. Die immunhistochemischen Präparate wurden dabei unabhängig von 2 Personen beurteilt. Dabei wurde der unten in Tab.11 angegebene Punktescore verwendet.

Tab.11 : Punktescore der semiquantitativen Auswertung

Punkte	Färbungsintensität
0	keine
1	schwach
2	positiv
3	stark
4	sehr stark

4.8.2. Densitometrische Auswertung

Die Färbungsintensität wurde mit dem Programm Analysis 3.1® Software, Soft Imaging System GmbH, Münster gemessen. Hierbei wurden immer drei zufällig ausgewählte Bereiche sowohl des Tumors als auch der Umgebungshaut erfaßt. Dabei wurden mit Hilfe der Negativkontrollen sogenannte Farbschwellwerte festgelegt. Sie wurden so gewählt, daß die gemessenen Färbungsintensitäten der Negativkontrollen dem Wert 0 entsprachen. Auch hier wurden wieder mehrere Bereiche des fotografierten Bereichs mit erfaßt. Die dann durchgeführte Einstellung wurde für die Messung jeden Tumors beibehalten. Von den ermittelten Werten wurde der Mittelwert gebildet.

4.9. Statistische Analyse

Zur statistischen Auswertung wurden zunächst von allen Datenreihen Mittelwert und Standardabweichung mit Hilfe des Programms Excel 7.0, Fa. Microsoft gebildet. Anschließend wurde mit dem Statistikprogramm Graph Pad InStat Version 3.05 (Graphpad, San Diego, Ca, USA) ANOVA-Tests (one-way analysis of variance) durchgeführt. Mit dem ANOVA-Test kann man den Mittelwert oder Median einer Variable bei drei oder mehr Gruppen vergleichen. Dabei definieren sich die drei oder mehr Gruppen nur durch eine Variable. Diese ist hier die Färbeintensität. In der vorliegenden Arbeit wurde die Färbeintensität des Tumors sowohl mit seiner Umgebung als auch mit der jungen Kontrollhaut verglichen. Um den ANOVA-Test durchzuführen, müssen die Daten einer Normalverteilung unterliegen. Dies wurde vorher bei allen Datenreihen mit Hilfe des Statistik-Programms geprüft.

Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant festgelegt.

Bei allen Daten sind Mittelwert und Standardfehler (SEM) angegeben.

5. Ergebnisse

5.1. Melanozytäre Tumoren

5.1.1. Expression von Cu/Zn-SOD

Die Epidermis gesunder Kontrollhaut zeigte eine homogene Anfärbung für Cu/Zn-SOD. Die Färbungsintensität lag bei $47,2 \pm 4,9 \%$. Hierbei wiesen Stratum corneum und Epidermis eine deutlich höhere Expression auf als die zellärmere Dermis.

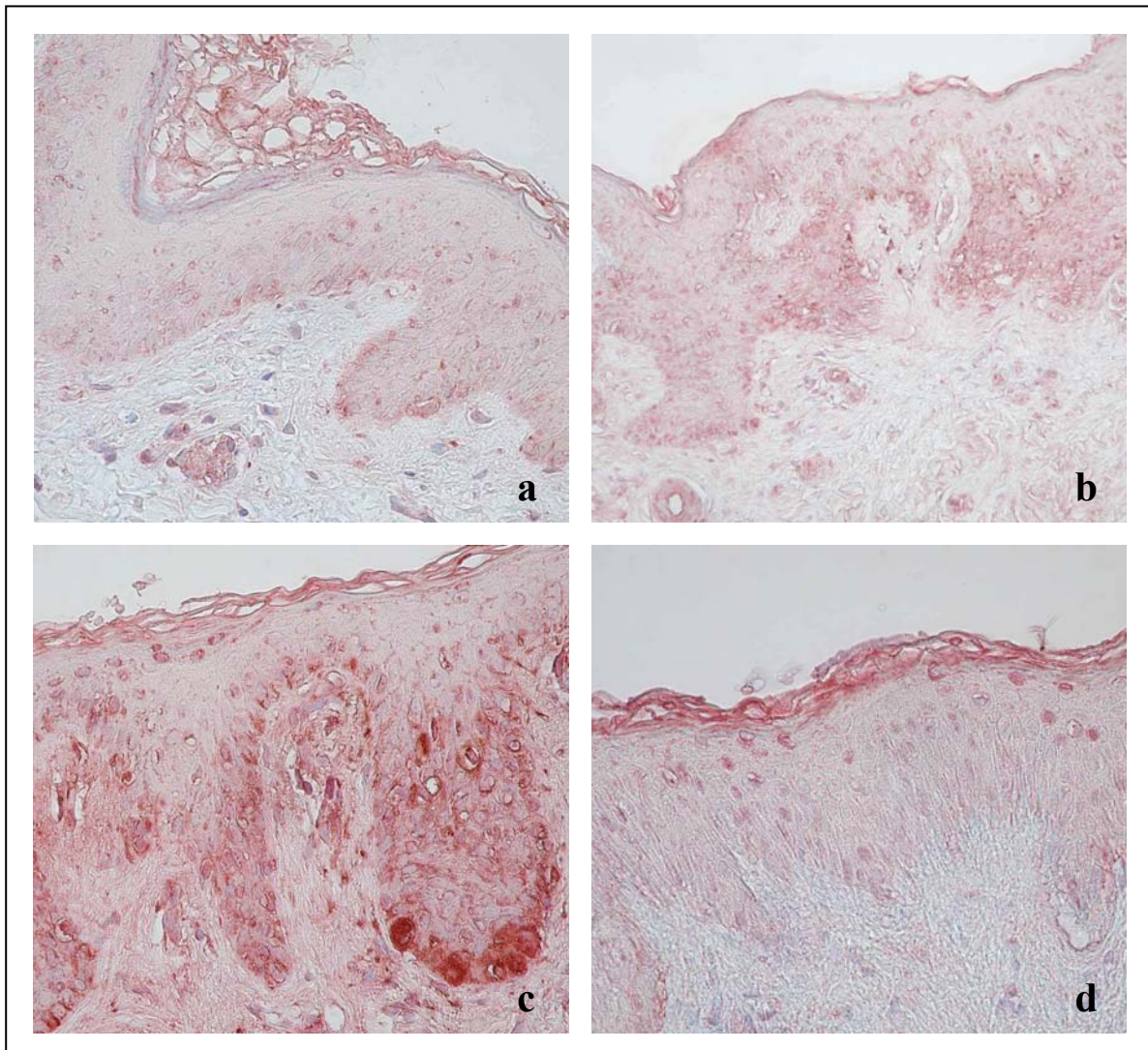


Abb.8: Expression von Cu/Zn-SOD (Vergrößerung b, c: 200 x; a, d: 400 x)

a: in junger, gesunder Haut

b: in einem benignen Nävus

c: in einem superfiziell spreitenden Melanom

d: in der Umgebungshaut eines superfiziell spreitenden Melanoms

Die Anfärbung benigner melanozytärer Nävi unterschied sich mit $47,0 \pm 6,5$ % Färbungsintensität kaum von der Färbungsintensität gesunder, junger Kontrollhaut. Ähnlich verhielt es sich mit der Umgebungshaut der Nävi. Hier lag die Färbungsintensität bei $40,7 \pm 3,1$ %.

Das superfiziell spreitendem Melanom wies eine stark erhöhte Expression der Cu/Zn-SOD auf. Die Anfärbung der Epidermis stellte sich mit $71,7 \pm 2,2$ % signifikant erhöht gegenüber der Gruppe der benignen Nävi dar ($p < 0,001$) und ebenfalls signifikant erhöht gegenüber der eigenen Umgebungshaut ($p < 0,01$).

Besonders stark schien die Expression des Enzyms in den basalen Schichten von Tumorzapfen zu sein. Auffällig waren hier besonders hyperplastische Zellen mit einer Hyperchromasie der Kerne wie in Abb.8 dargestellt. Diese zeigten die stärkste Anfärbung. Übrige, nicht von Tumorzellen durchsetzte Teile der Epidermis, wirkten zum Teil kaum anders als die Epidermis der Kontrollgruppe.

In der Gruppe der benignen Nävi waren zum Teil ebenfalls Kernatypien und Zellvergrößerung festzustellen. Dennoch war die Expression der Cu/Zn-SOD nicht wesentlich verändert im Vergleich zur Kontrollgruppe. Abb.9 stellt die Expression von Cu/Zn-SOD beim superfiziell spreitenden Melanom im Vergleich zur Umgebungshaut des Tumors und zu junger, gesunder Kontrollhaut graphisch dar.

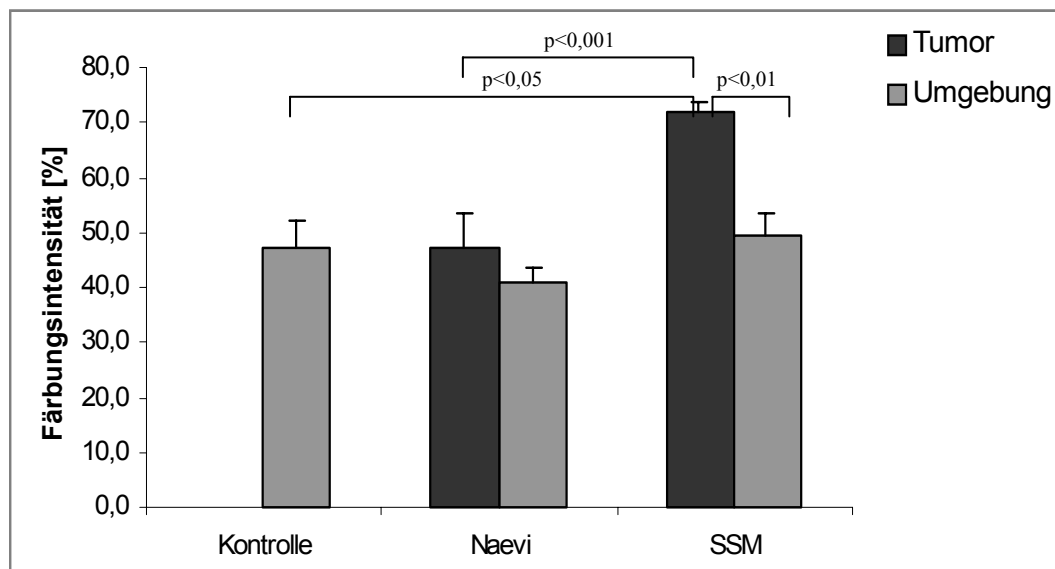


Abb.9: Expression von Cu/Zn-SOD beim superfiziell spreitenden Melanom im Vergleich zur Umgebungshaut des Tumors und zu junger, gesunder Kontrollhaut

5.1.2. Expression von Mn-SOD

Junge, gesunde Kontrollhaut zeigte mit $17,4 \pm 2,3$ % eine relativ geringe Färbungsintensität. Biopate von Patienten mit benignen Nävi wiesen mit $22,9 \pm 3,0$ % nur eine gering höhere Anfärbung auf. Bei beiden Gruppen zeigte die Anfärbung eine homogene Verteilung in der Epidermis.

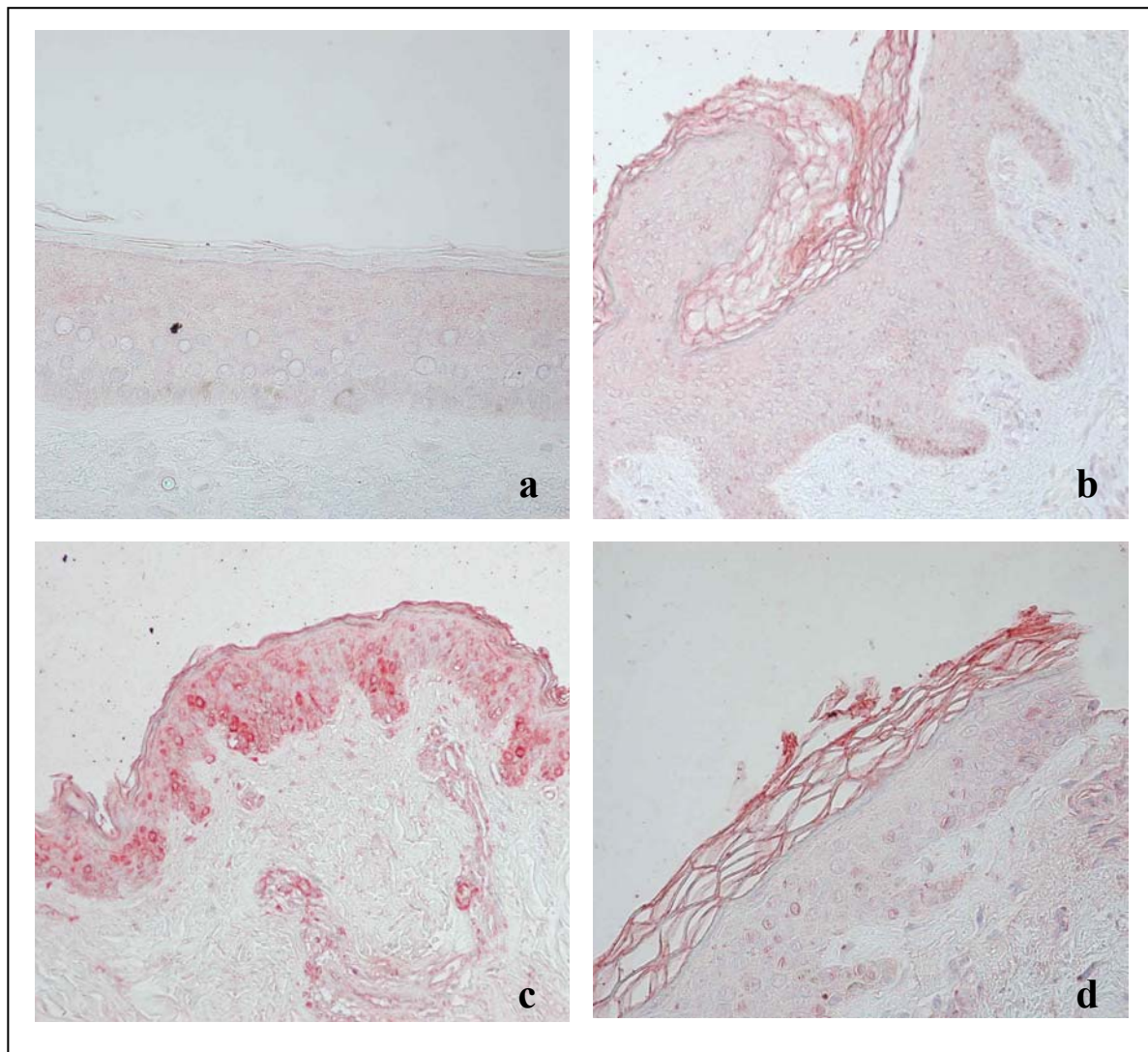


Abb.10: Expression von Mn-SOD (Vergrößerung b, c: 200 x; a, d: 400 x)

a: in junger, gesunder Haut

b: in einem benignen Nävus

c: in einem superfiziell spreitenden Melanom

d: in der Umgebungshaut eines superfiziell spreitenden Melanoms

Dagegen zeigte das superfiziell spreitende Melanom mit $39,6 \pm 4,1$ % eine signifikant höhere Expression von Mn-SOD im Vergleich zu junger, gesunder Kontrolle ($p < 0,01$). Ähnlich wie schon bei der Cu/Zn-SOD bestand ebenfalls ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu benignen Nävi ($p < 0,05$) und zur Umgebungshaut des Tumors ($p < 0,001$). Auch das Expressionsmuster entsprach in seiner Verteilung dem der Cu/Zn-SOD. Die Anfärbung war am höchsten in Tumorarealen mit vergrößerten Zellen und hyperchromatischen Kernen (siehe Abb.10). Auch Tumorverbände, die die Basalmembran bereits durchbrochen hatten, zeigten eine starke Anfärbung des Enzyms. Abb.11 stellt die Expression von Mn-SOD beim superfiziell spreitenden Melanom im Vergleich zur Umgebungshaut des Tumors und zu junger, gesunder Kontrollhaut graphisch dar.

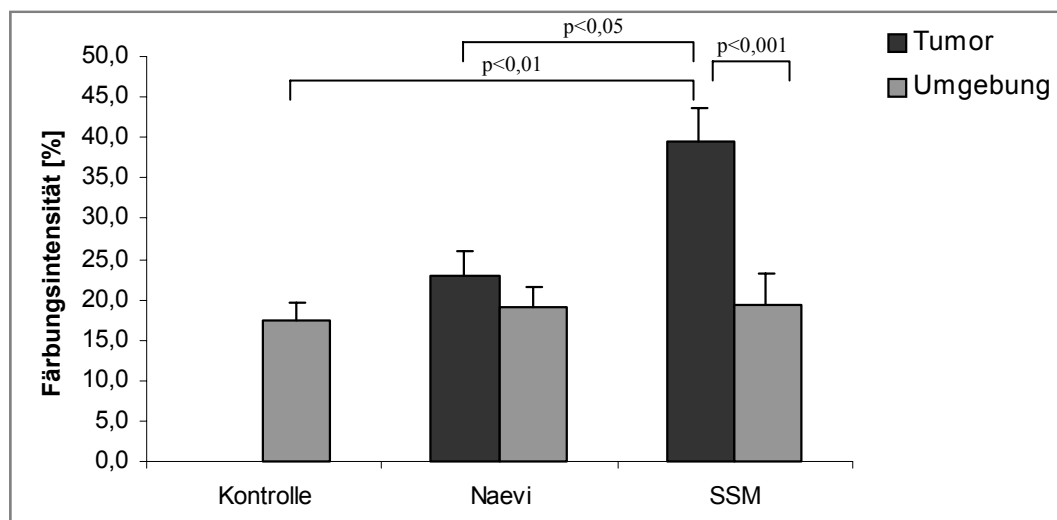


Abb.11: Expression von Mn-SOD bei melanozytären Tumoren im Vergleich zur Umgebungshaut des Tumors und zu junger, gesunder Kontrollhaut

5.1.3. Expression von Catalase

Junge, gesunde Haut wies mit $33,6 \pm 6,0$ % eine ähnliche Anfärbung auf wie die Gruppe benigner Nävi mit $36,0 \pm 4,6$ %. Beide Gruppen zeigten wieder eine homogene Verteilung der Anfärbung, die ausschließlich auf die Epidermis beschränkt blieb.

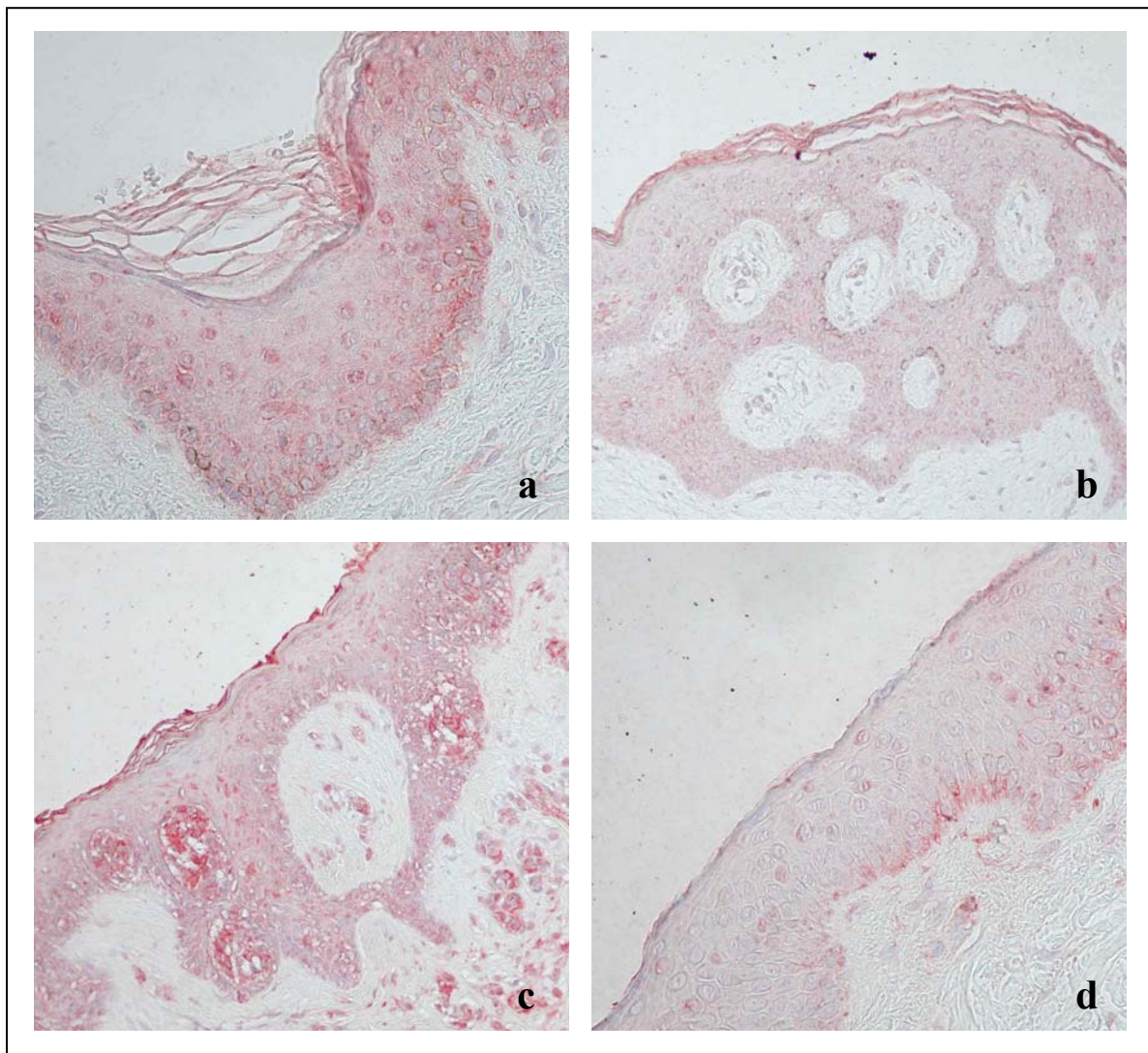


Abb.12: Expression von Catalase (Vergrößerung b, c: 200 x; a, d: 400 x)

a: in junger, gesunder Haut

b: in einem benignen Nävus

c: in einem superfiziell spreitenden Melanom

d: in der Umgebungshaut eines superfiziell spreitenden Melanoms

Das superfiziell spreitende Melanom zeigte mit $58,0 \pm 4,7$ % wiederum eine stark erhöhte Expression der Catalase im Vergleich zu junger, gesunder Haut ($p < 0,01$). Gegenüber der Gruppe der benignen Nävi bestand eine signifikante Steigerung ($p < 0,001$).

Die Expression von Catalase in der Umgebungshaut des Tumors zeigte sich mit $25,0 \pm 4,8$ % signifikant erniedrigt im Vergleich zum Tumor selber ($p < 0,001$).

Auffällig war erneut die Verteilung des Enzyms. Am stärksten angefärbt zeigten sich die Bereiche mit den deutlichsten Zellatypien, gezeigt in Abb.12. Wiederum fanden sich beim superfiziell spreitenden Melanom Tumorverbände in der Dermis, die die Basalmembran bereits durchbrochen hatten und die deutlich angefärbt waren. Benigne Nävi zeigten nur epidermale Anfärbungsbereiche. Abb.13 stellt die Expression von Catalase beim superfiziell spreitenden Melanom im Vergleich zur Umgebungshaut des Tumors und zu junger, gesunder Kontrollhaut graphisch dar.

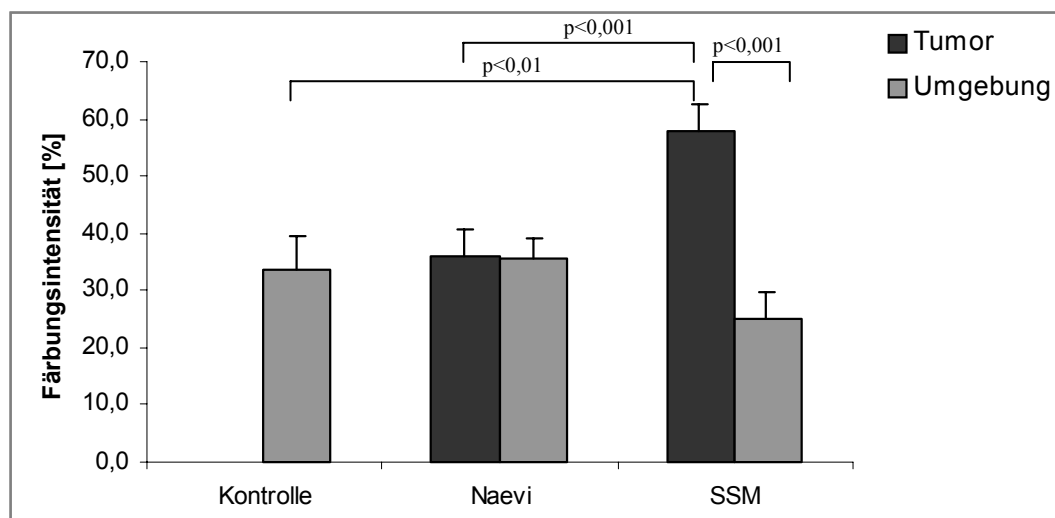


Abb.13: Expression von Catalase bei melanozytären Tumoren im Vergleich zur Umgebungshaut des Tumors und zu junger, gesunder Kontrollhaut

5.1.4. Untersuchung auf Malondialdehyd

In junger, gesunder Haut fand sich mit $13,2 \pm 2,0$ % nur eine geringe Konzentration des Lipidperoxidationsproduktes Malondialdehyd.

Auch Haut der Gruppe benigner Nävi wies keine besonders erhöhte Konzentration von MDA auf ($16,6 \pm 2,5$ %).

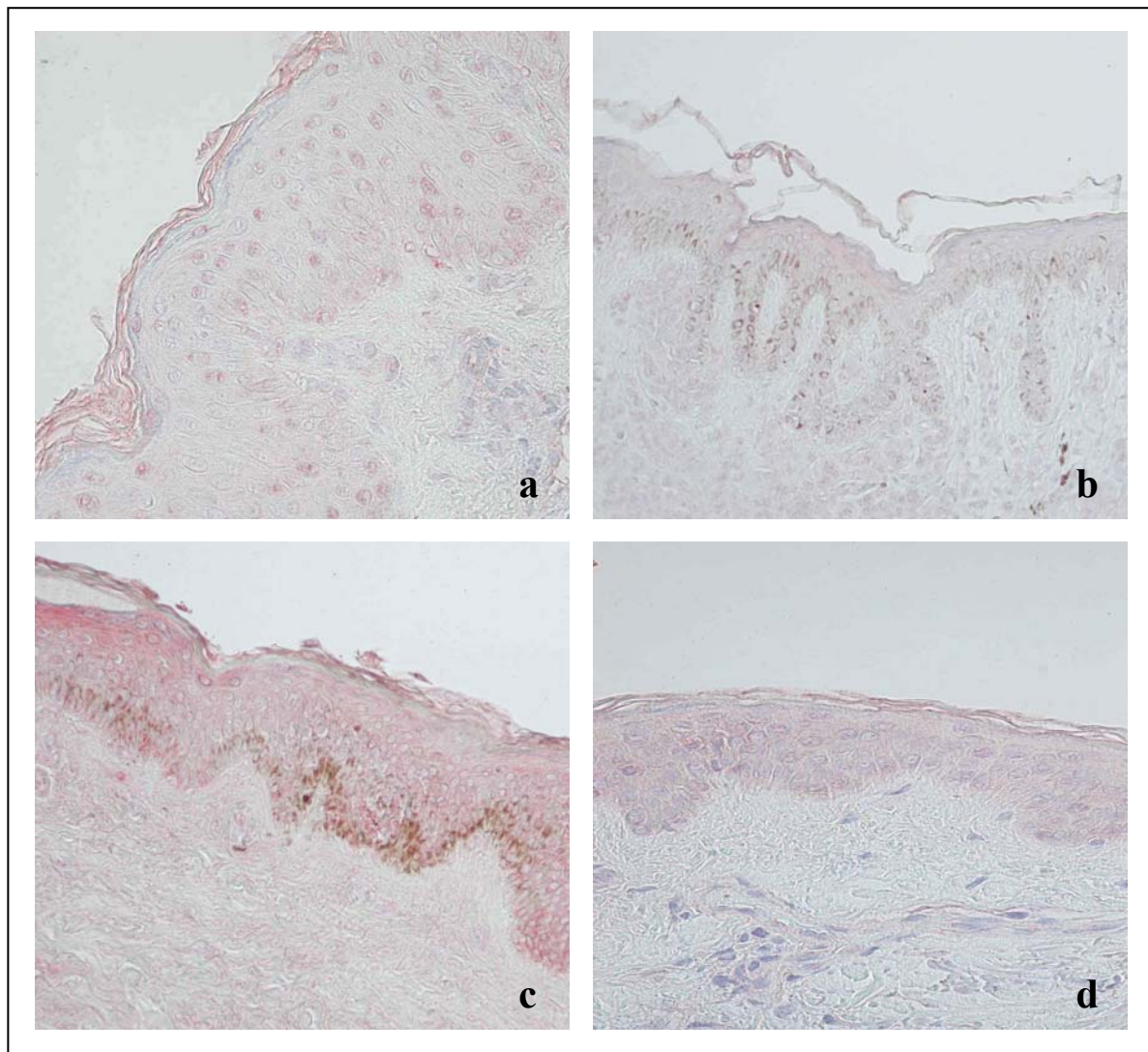


Abb.14: Darstellung von MDA (Vergrößerung b, c: 200 x; a, d: 400 x)

a: in junger, gesunder Haut

b: in einem benignen Nävus

c: in einem superfiziell spreitenden Melanom

d: in der Umgebungshaut eines superfiziell spreitenden Melanoms

Bei beiden Gruppen ließen sich hier einzelne Zellen der Epidermis ausmachen, die im Vergleich zu übrigen Zellen der Epidermis eine weitaus höhere Anfärbung aufwiesen (siehe Abb.14). Das Anfärbungsmuster war also bei weitem nicht so homogen gestaltet, wie bei den Anfärbungen der antioxidativen Enzyme. Diese Zellen zeigten zum Teil interessanterweise einen deutlichen vergrößerten Kern.

Das superfiziell spreitende Melanom zeigte eine deutliche Akkumulation von Malondialdehyd, $42,7 \pm 5,0$ %. Sie war signifikant erhöht gegenüber der Kontrollhaut ($p < 0,001$) und ebenso gegenüber der Gruppe der benignen Nävi ($p < 0,001$).

In der Umgebung des Tumors fand sich mit $19,1 \pm 2,0$ % eine deutliche Häufung des Lipidperoxidationsproduktes im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Malondialdehyd fand sich jedoch nicht nur in Tumorzellen, sondern ließ sich auch in benachbarten Keratinozyten nachweisen. Abb.15 stellt die Ergebnisse der Untersuchung auf Malondialdehyd bei melanozytären Tumoren graphisch dar.

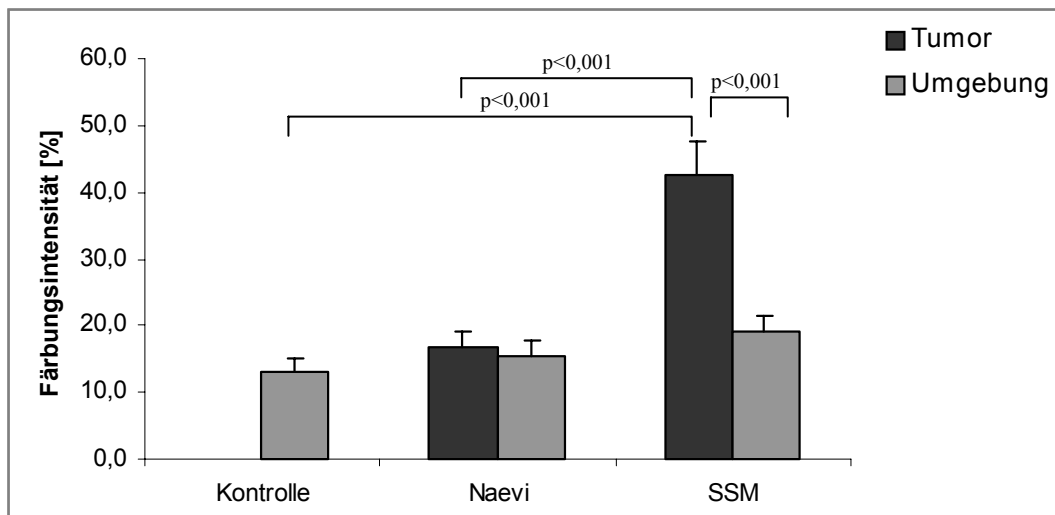


Abb.15: Densitometrische Analyse der Anreicherung des Lipidperoxidationsproduktes Malondialdehyd bei melanozytären Tumoren im Vergleich zur Umgebungshaut des Tumors und zu junger, gesunder Kontrollhaut

5.2. Epidermale Tumoren

5.2.1. Expression von Cu/Zn-SOD

Bei den epidermalen Tumoren zeigte sich im allgemeinen eine verminderte Expression der Cu/Zn-SOD im Vergleich zu gesunder Epidermis. Abb. 16 stellt einige Mikrofotogramme der Untersuchung auf Cu/Zn-SOD bei epidermalen Hauttumoren dar.

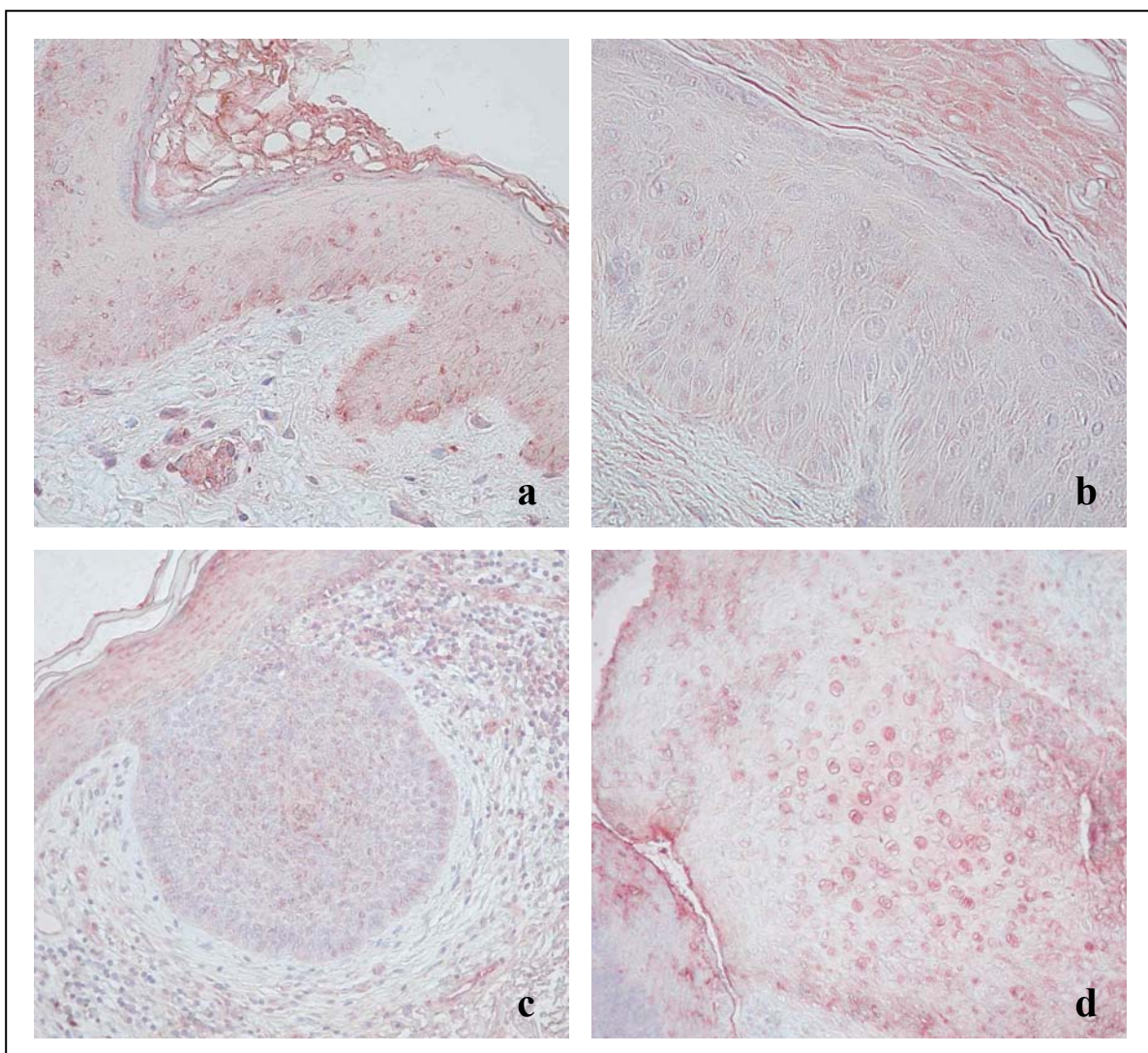


Abb.16: Expression von Cu/Zn-SOD (Vergrößerung a: 400 x;b-d: 200 x)

a: in junger, gesunder Haut

b: in einer aktinischen Keratose

c: in einem Basalzellkarzinom

d: in einem spinözellulären Karzinom

Die aktinische Keratose wies mit $32,0 \pm 4,0$ % eine geringere Anfärbung auf als die Kontrollgruppe mit $47,2 \pm 4,9$ %. Auch die Anfärbung des Basalzellkarzinoms war mit $38,7 \pm 6,8$ % geringer als die der Kontrolle. Die Expression des Enzyms war ebenfalls vermindert bei der Gruppe der spinözellulären Karzinome. Hier wies der Tumor eine Anfärbung von $32,9 \pm 3,4$ % auf. Interessanterweise zeigte die Umgebungshaut des Tumors eine noch geringere Expression der Cu/Zn-SOD als der Tumor selber. Die Anfärbung in der Umgebungshaut der spinözellulären Karzinome betrug $21,7 \pm 2,4$ % und war damit signifikant geringer als in junger, gesunder Haut ($p < 0,01$).

Ähnlich verhielt es sich mit der Umgebungshaut des Basalzellkarzinoms. Auch hier war die Expression mit $25,7 \pm 4,1$ % signifikant geringer als in der Kontrollgruppe ($p < 0,05$).

Abb.17 stellt die Expression von Cu/Zn-SOD bei den verschiedenen untersuchten epidermalen Hauttumoren im Vergleich zur Umgebungshaut des Tumors und zu junger, gesunder Kontrollhaut graphisch dar.

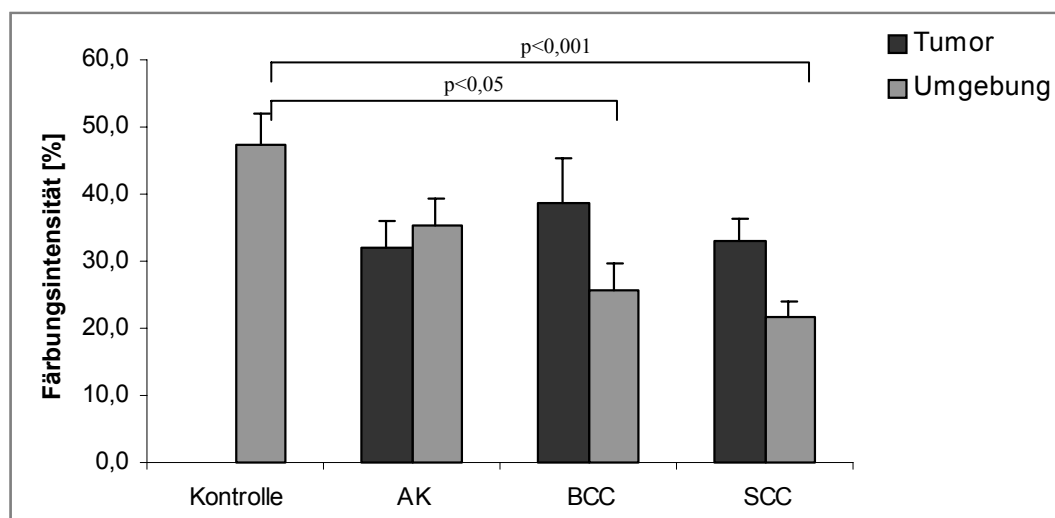


Abb.17: Expression von Cu/Zn-SOD bei verschiedenen epidermalen Tumoren im Vergleich zur Umgebungshaut des Tumors und zu junger, gesunder Kontrollhaut

5.2.2. Expression von Mn-SOD

Hier zeigten alle untersuchten Hautveränderungen eine ähnliche Expression der Mn-SOD wie die Kontrollgruppe mit junger, gesunder Epidermis. Abb. 18 stellt einige Mikrofotogramme der Untersuchung auf Mn-SOD bei epidermalen Hauttumoren dar.

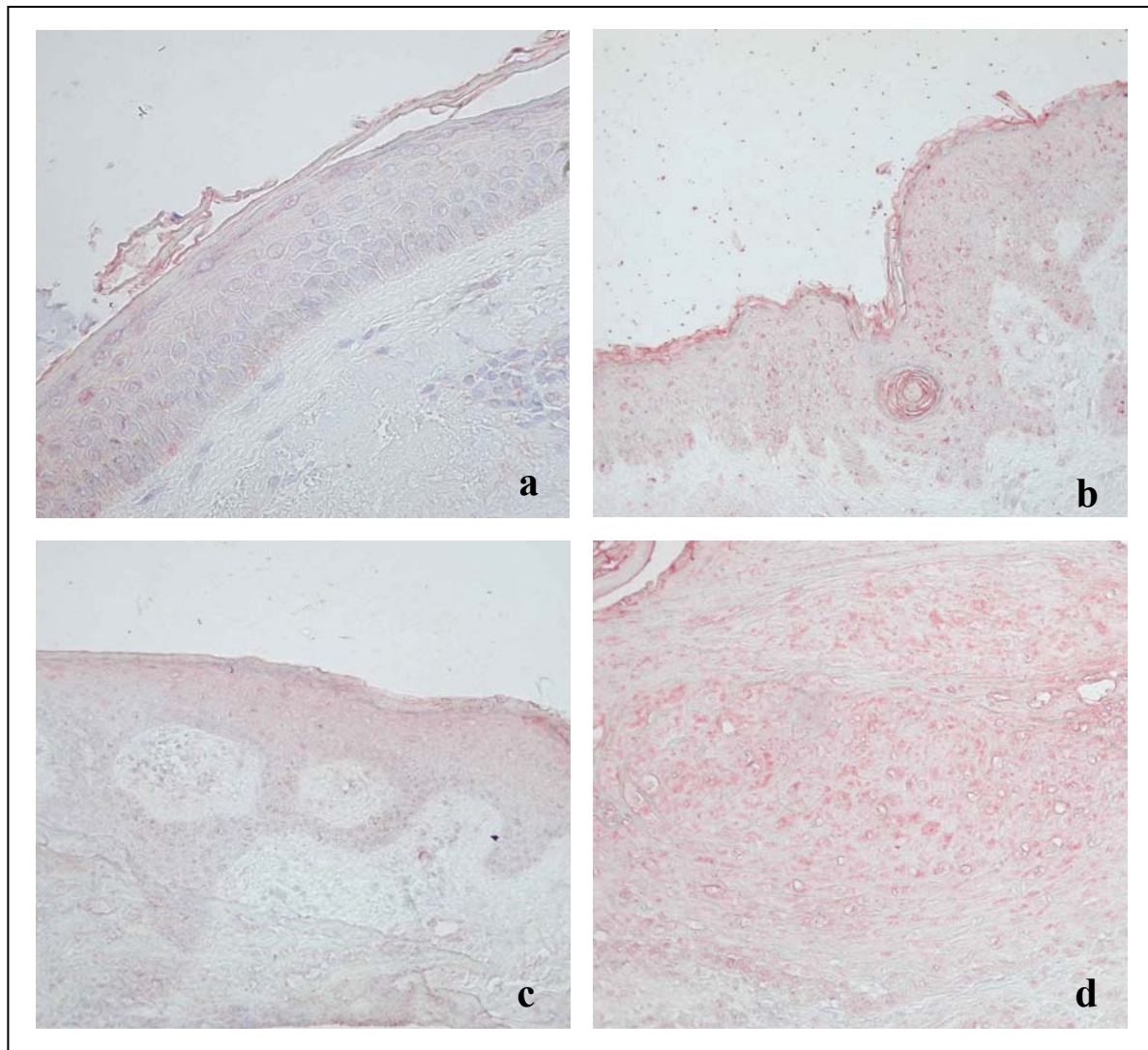


Abb.18: Expression von Mn-SOD (Vergrößerung a: 400 x; b-d: 200 x)

a: in junger, gesunder Haut

b: in einer aktinischen Keratose

c: in einem Basalzellkarzinom

d: in einem spinözellulären Karzinom

Die aktinische Keratose zeigte eine Anfärbung von $25,6 \pm 3,5$ %, im Vergleich zur Kontrollgruppe mit $17,4 \pm 2,3$ % nur wenig erhöht.

Das Basalzellkarzinom wies eine Expression der Mn-SOD von $20,5 \pm 4,4$ % auf, das spinözelluläre Karzinom von $20,2 \pm 2,9$ %.

Die Expression von Mn-SOD war bei allen drei untersuchten Tumoren im Vergleich zu ihrer Umgebungshaut nur wenig verändert. Abb.19 stellt die Expression der Mn-SOD bei den verschiedenen untersuchten epidermalen Hauttumoren im Vergleich zur Umgebungshaut des Tumors und zu junger, gesunder Kontrollhaut graphisch dar.

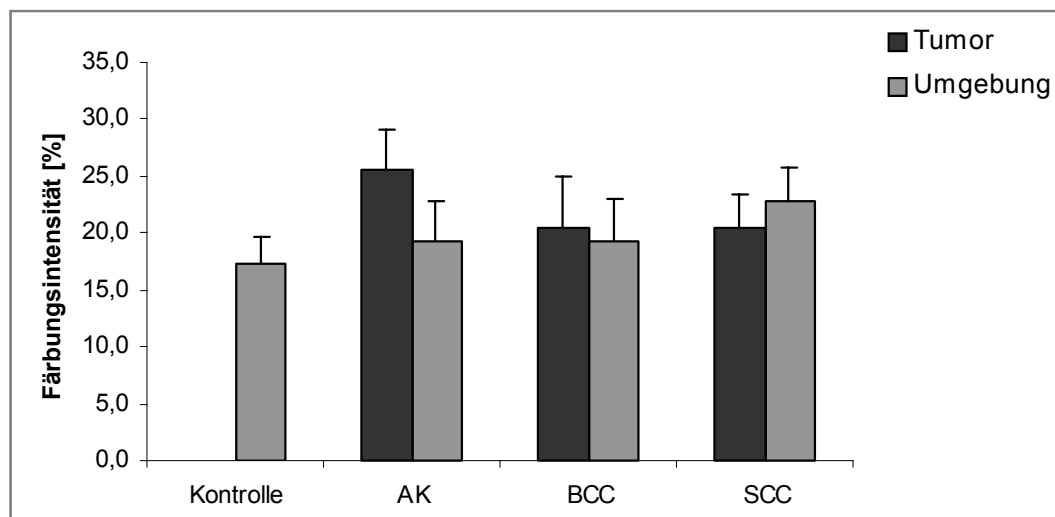


Abb.19: Expression von Mn-SOD bei verschiedenen epidermalen Tumoren im Vergleich zur Umgebungshaut des Tumors und zu junger, gesunder Kontrollhaut

5.2.3. Expression von Catalase

Es konnte eine Verminderung der Expression von Catalase bei allen Tumoren im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Abb. 20 stellt einige Mikrofotogramme der Untersuchung auf Catalase bei epidermalen Hauttumoren dar.

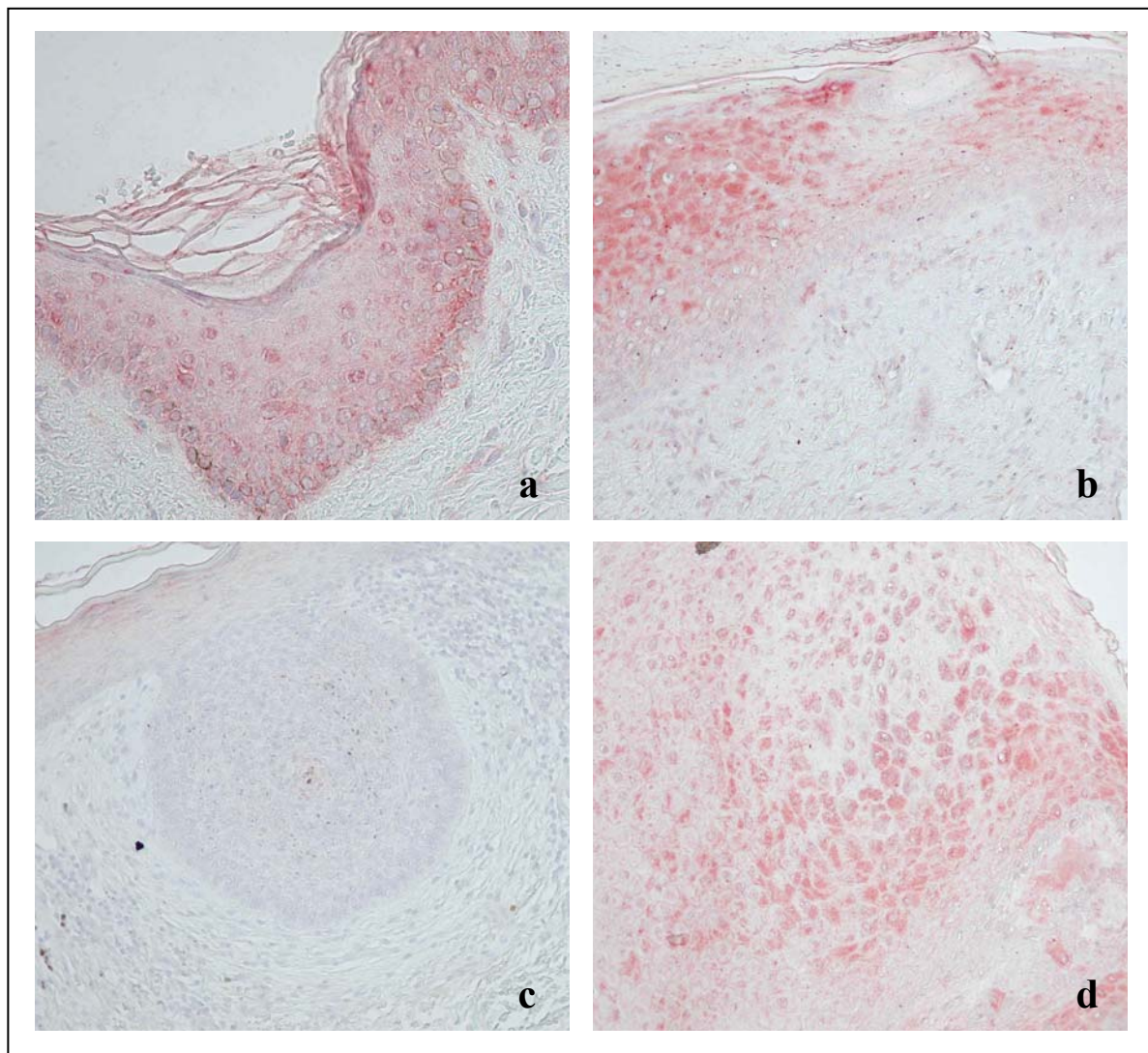


Abb.20: Expression von Catalase (Vergrößerung a: 400 x; b-d: 200 x)

a: in junger, gesunder Haut

b: in einer aktinischen Keratose

c: in einem Basalzellkarzinom

d: in einem spinözellulären Karzinom

Die aktinische Keratose als präkanzeröse Veränderung des spinozellulären Karzinoms wies die geringste Veränderung auf. Hier war die Expression von Catalase mit $24,6 \pm 4,6$ % geringer als die der Kontrolle mit $33,6 \pm 6,0$ %.

Das Basalzellkarzinom wies die stärkste Verminderung der Expression von Catalase aller Tumoren auf. Die Anfärbung war mit $14,0 \pm 3,0$ % signifikant geringer ($p < 0,05$) als die der Kontrollgruppe.

Das spinozelluläre Karzinom zeigte ebenfalls eine verminderte Färbungsintensität als junge, gesunde Kontrollhaut. Sie lag bei $20,5 \pm 2,9$ %. Eine signifikant geringere Expression des Enzyms im Vergleich zu gesunder Epidermis war bei der Umgebungshaut des spinozellulären Karzinoms zu finden. Hier betrug die Anfärbung $14,9 \pm 2,0$ % ($p < 0,05$).

Abb.21 stellt die Expression der Catalase bei den verschiedenen untersuchten epidermalen Hauttumoren im Vergleich zur Umgebungshaut des Tumors und zu junger, gesunder Kontrollhaut graphisch dar.

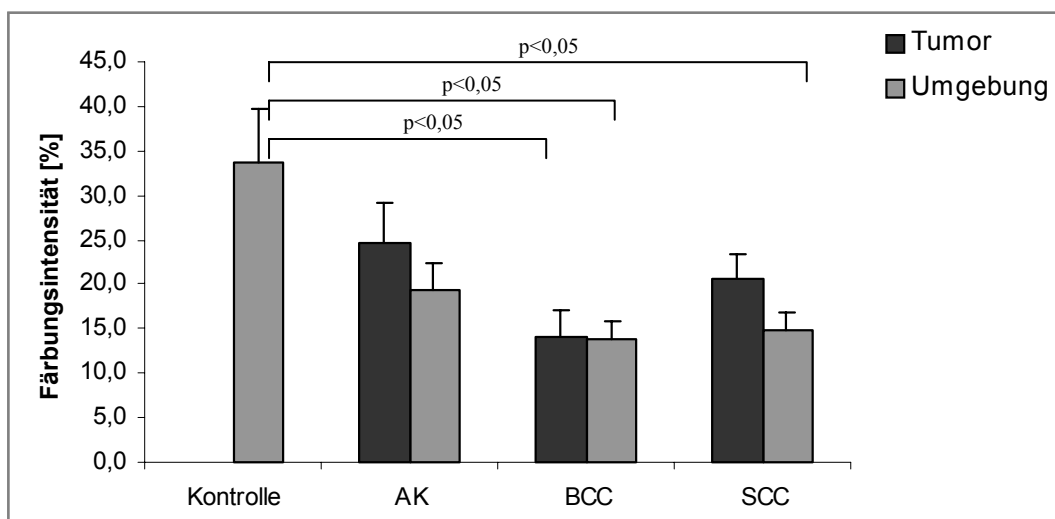


Abb.21: Expression von Catalase bei verschiedenen epidermalen Tumoren im Vergleich zur Umgebungshaut des Tumors und zu junger, gesunder Kontrollhaut

5.2.4. Untersuchung auf Malondialdehyd

Alle untersuchten epidermalen Hautveränderungen, einschließlich der aktinischen Keratose, zeigten einen Anstieg des Lipidperoxidationsproduktes Malondialdehyd. Allerdings nur das spinözelluläre Karzinom zeigte im Vergleich zu junger, gesunder Kontrollhaut und zur Umgebungshaut des Tumors eine Signifikanz. Abb. 20 stellt einige Mikrofotogramme der Untersuchung auf Malondialdehyd bei epidermalen Hauttumoren dar.

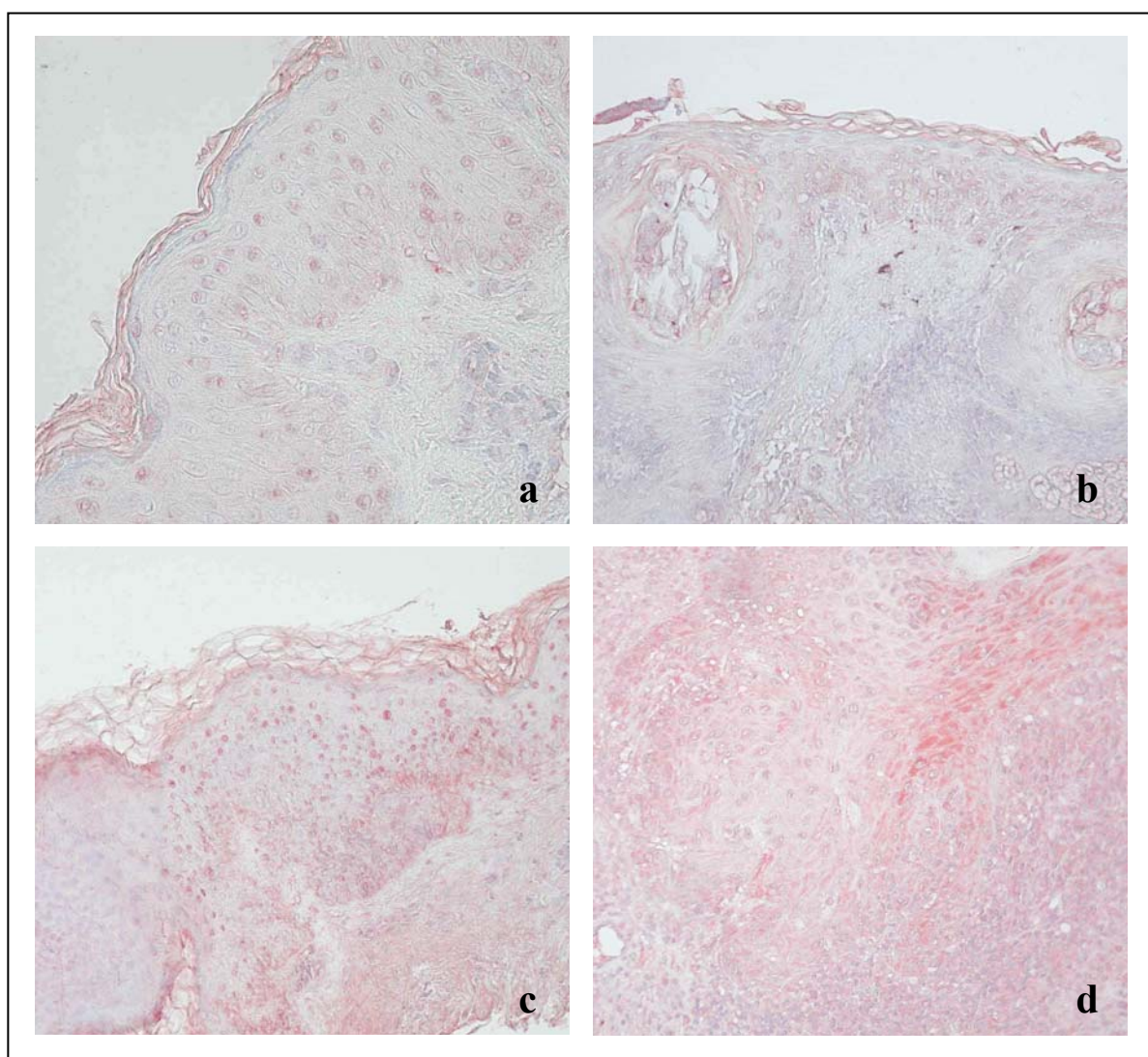


Abb.22: Darstellung von MDA (Vergrößerung a: 400 x; b-d: 200 x)

a: in junger, gesunder Haut

b: in einer aktinischen Keratose

c: in einem Basalzellkarzinom

d: in einem spinözellulären Karzinom

Im Gegensatz zu den untersuchten melanozytären Tumoren war der Anstieg von MDA bei den anderen untersuchten epidermalen Hautveränderungen eher moderat.

Bei der aktinischen Keratose wurde eine Färbungsintensität von $26,1 \pm 3,8$ % gemessen.

Das Basalzellkarzinom zeigte mit $25,7 \pm 2,7$ % eine ähnlich hohe Akkumulation.

Nur das spinozelluläre Karzinom jedoch zeigte signifikante Veränderungen. Hier lag die Färbintensität mit $29,7 \pm 3,4$ % signifikant über der der Kontrollgruppe mit $13,2 \pm 2,0$ % ($p < 0,05$). Die Umgebungshaut des spinozellulären Karzinoms zeigte eine Anfärbung von $10,8 \pm 1,9$ % und besaß damit eine signifikant geringere Akkumulation von MDA als der Tumor ($p < 0,001$).

Die Umgebung aller drei Tumoren war im Vergleich zu gesunder Haut fast nicht verändert.

Abb.23 stellt die Ergebnisse der Untersuchung auf Malondialdehyd bei epidermalen Tumoren graphisch dar.

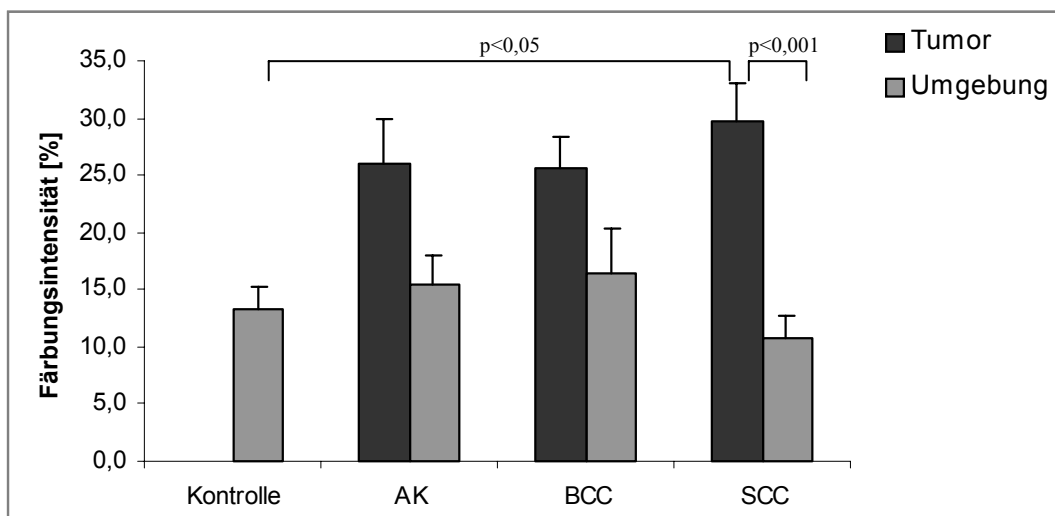


Abb.23: Densitometrische Analyse der Anreicherung des Lipidperoxidationsproduktes Malondialdehyd bei verschiedenen epidermalen Tumoren im Vergleich zur Umgebungshaut des Tumors und zu junger, gesunder Kontrollhaut

6. Diskussion

Der Einfluß verschiedener Faktoren, vor allem der UV-Strahlung, auf das antioxidative Netzwerk der Haut wird gegenwärtig intensiv untersucht. Dabei wird die UV-Strahlung als ein Hauptfaktor in der Ätiologie von melanozytären wie epidermalen Hauttumoren angesehen. In der vorliegenden Arbeit wurden mit immunhistochemischen Methoden UV-assoziierte epidermale und melanozytäre Hautveränderungen in Bezug auf die Expression der antioxidativen Enzyme und die Anreicherung des Lipidperoxidaionsproduktes Malondialdehyd untersucht. Für das maligne Melanom ist es die erste Untersuchung dieser Art *ex vivo*.

Die Verteilung und Expression von antioxidativen Enzymen bei UV-induzierten Schädigungen und der Karzinogenese der Haut spielt gemeinsam mit dem Faktor der Lipidperoxidation eine entscheidende Rolle. Die Hypothese der vorliegenden Arbeit ist, daß in Hauttumoren das natürliche Redoxgleichgewicht zugunsten oxidativer Bedingungen verschoben ist. Diese Imbalance könnte zu einer Akkumulation von Lipidperoxidaionsprodukten führen und Einfluß auf die Karzinogenese epidermaler und melanozytärer Tumoren haben.

Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß sich beim superfiziell spreitenden Melanom eine, im Vergleich zur Umgebungshaut des Tumors, benignen Nävi und junger, gesunder Kontrollhaut, signifikante Steigerung der Expression der untersuchten antioxidativen Enzyme Catalase und Superoxiddismutase fand.

Gleichzeitig zur erhöhten Expression antioxidativer Enzyme zeigte sich beim superfiziell spreitenden Melanom eine signifikante Erhöhung des Lipidperoxidaionsmarkers Malondialdehyd (MDA). Dabei waren die Veränderungen nicht nur in Kernbereichen des Tumors, sondern auch in umgebenden Keratinozyten nachzuweisen.

Im Gegensatz dazu wiesen die epidermalen Tumoren ein zum Teil stark gestörtes antioxidatives Netzwerk im Vergleich zu gesunder Haut auf. Das Basalzellkarzinom zeigte eine signifikante Verringerung der Aktivität der Catalase. Die Expression der Cu/Zn-SOD war dagegen nur leicht vermindert. Beim spinözellulären Karzinom verhielt es sich umgekehrt. Hier war die Cu/Zn-SOD stärker vermindert als die Catalase. Die Expression von Mn-SOD zeigte im Vergleich zur Umgebungshaut des Tumors und junger, gesunder Kontrollhaut bei beiden Tumoren keine wesentliche Änderung.

Die epidermalen Tumoren wiesen zudem im Gegensatz zu dem untersuchten melanozytären Tumor nur einen moderaten Anstieg von MDA auf.

All dies weist daraufhin, daß oxidativer Streß eine unterschiedliche Rolle in der Pathophysiologie von melanozytären und epidermalen Hauttumoren spielt.

6.1. Melanozytäre Tumoren

Besonderes Augenmerk gilt der Frage nach einer Korrelation zwischen antioxidativem Status, Lipidperoxidation und Tumorgenese.

Dabei sind die Ursachen der malignen Transformation der Melanozyten zu Melanomzellen nur teilweise geklärt. Die Rolle von UV-Strahlung als Faktor in der Ätiologie wird gegenwärtig kontrovers diskutiert. Die Inzidenz des Melanoms korreliert nicht mit kumulativer Exposition zu UV-Strahlung. Des weiteren ist der Tumor eher selten im Gesicht oder auf den Händen zu finden, den Stellen höchster UV-Exposition. Trotz höherer, chronischer Exposition zu UV-Strahlung und höherer Inzidenz von nicht-melanozytären Hauttumoren, haben Menschen, die im Freien arbeiten, eine geringere Inzidenz von Melanomen (Matsui und DeLeo, 1995). Die Tatsache jedoch, daß Patienten mit Xeroderma-Pigmentosum, einem autosomal-rezessiv vererbbaeren Defekt in der Exzisions-Reparatur der DNA nach UV-induzierten Schäden, mit einer erhöhten Inzidenz von verschiedenen Hauttumoren, darunter auch dem Melanom, konfrontiert sind, unterstützt die These einer UV-Beteiligung bei der Entwicklung von melanozytären Tumoren (Lambert und Lambert, 1995).

Dabei scheinen einige epidemiologische Daten darauf hinzuweisen, daß immer wiederkehrende, sehr intensive Exposition zu UV-Strahlung, besonders in einem jungen Lebensalter, ein Risikofaktor für die Entstehung von Melanomen sind (Armstrong, 1988). So ist die Gefahr des Auftretens eines Melanoms bei schmerzhaften Sonnenbränden in der Kindheit oder Adoleszenz um das zwei- bis dreifache erhöht, wobei nicht nur die Stärke des Sonnenbrandes, sondern auch die Häufigkeit entscheidend ist (Weiss et al., 1990). UV-Strahlung gehört wohl dennoch zu den entscheidenden Faktoren. Dafür spricht vor allem die Tatsache, daß das Melanom-Vorkommen bei weißer Bevölkerung zehn bis hundert mal höher ist als bei Schwarzen oder Asiaten (Garbe und Orfanos, 1989).

Bekannt ist, daß sich normale Melanozyten und Melanomzellen in ihrer antioxidativen Kapazität unterscheiden. Die Frage der Reaktion von Melanomzellen auf oxidativen Streß

wird kontrovers erörtert. Bisher konnte gezeigt werden, daß Melanozyten und Melanomzellen unterschiedlich auf oxidativen Streß reagieren (Picardo et al., 1996; Meyskens et al., 2001).

Um das Verteidigungssystem gegen freie Radikale zu beurteilen, verglichen Picardo et al normale Melanozyten von gesunden Patienten mit Melanomzellen und normalen Melanozyten von Melanompatienten. Dabei zeigten die Melanomzellen eine erhöhte Konzentration an ungesättigten Fettsäuren. Auch eine erhöhte Aktivität von Superoxiddismutase ließ sich, ebenso wie in der vorgelegten Arbeit, nachweisen. Die Aktivität der Catalase dagegen war verringert, im Gegensatz zu den hier gezeigten Ergebnissen. Auch Veränderungen bezüglich des Vitamin E und des Ubiquinons wurden beschrieben. Die Melanomzellen besaßen einen erhöhten Gehalt an Vitamin E und einen verringerten Gehalt an Ubiquinon. Es wurden ebenfalls normale Melanozyten von Melanompatienten untersucht und in zwei Gruppen differenziert. Die eine besaß ähnliche Eigenschaften wie die normalen Melanozyten. Die andere Gruppe jedoch zeigte ähnliche Veränderungen wie die Melanomzellen (Picardo et al., 1996). Die Abweichungen in der Umgebungshaut des Tumors, die in der vorliegenden Arbeit aufgezeigt werden, zeichnen ein etwas anderes Bild. Die festgestellten Modifikationen im antioxidativen enzymatischen Verhältnis in der Umgebungshaut des superfiziell spreitenden Melanoms waren sehr gering ausgeprägt, sowohl bei der Catalase als auch bei der Superoxiddismutase. Es konnte dagegen eine leichte Anreicherung von Malondialdehyd im Vergleich zu junger, gesunder Haut nachgewiesen werden. Wichtig zu erwähnen ist allerdings, daß die gemessenen Veränderungen keine Aufteilung in Melanozyten und Keratinozyten erlaubt, da nur die Ränder des Tumors allgemein betrachtet wurde. Dennoch scheint dies ein Indiz für erhöhten oxidativen Streß auch in der Umgebung des Tumors zu sein. Die umgebenden Zellen scheinen unfähig, adäquat auf diesen Streß zu reagieren, möglicherweise da dieser endogen durch den Tumor entsteht. Dies könnte im Zusammenhang mit der bekannten Tatsache der endogenen Radikalbildung durch Melanomzellen stehen (Bittinger et al., 1998).

Auch Grammatico et al konnten eine Veränderung des antioxidativen Status feststellen. Sie verglichen Melanozyten von Melanompatienten mit normalen Melanozyten und fanden eine signifikante Verringerung in der Aktivität der Catalase zusammen mit einem Anstieg des Gehaltes an Vitamin E. Die Aktivität der SOD war nicht signifikant verändert (Grammatico et al., 1998). Allerdings fanden sich diese Veränderungen lediglich in 5 von 11 Zellkulturen. Außerdem verglich Grammatico, im Gegensatz zu Picardo, Melanomzellen mit Melanozyten gesunder Patienten.

In vitro fand sich ein verringerter Spiegel an Ferritin und Glutathion bei verschiedenen Melanomzelllinien im Vergleich zu normaler Haut. Eine Reaktion der Melanomzellen auf UVA-Bestrahlung blieb aus, die Zellen schienen resistent gegen oxidativen Streß zu sein (Applegate et al., 1996).

Meyskens et al. demonstrierten, daß Melanomzellen weit weniger effektiv auf oxidativen Streß reagieren als normale Melanozyten (Meyskens et al., 1997).

Verschiedene andere Ansätze ergaben eine Erhöhung der Expression von sowohl Mn- als auch Cu/Zn-SOD bei humanen Melanomzellen als Reaktion auf oxidativen Streß. Schadendorf wies signifikante Erhöhungen des Mn-SOD Serumspiegels beim malignen Melanom nach. Die Erhöhung entsprach dabei der Größe des Tumors und korrelierte mit der Progression des Tumors (Schadendorf et al., 1995). Dies läßt sich mit bekannten Ergebnissen vereinbaren, wonach Mn-SOD Tumorzellen vor verschiedenen Zytokinen und Chemotherapeutika schützt (Wong et al., 1989; Hirose et al., 1993). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde eine im Vergleich zur junger, gesunder Kontrollhaut signifikante Erhöhung der Expression von Mn-SOD beim Melanom nachgewiesen ($p < 0,01$).

Das antioxidative Netzwerk ist also, im Vergleich zu gesunder, normaler Haut, verändert.

Verschiedene Transkriptionsfaktoren wie ICAM-1 oder NF- κ B zeigen eine Abhängigkeit von der oxidativen Balance der Zelle. Bei *in vitro*-Versuchen mit humanen Melanomzellreihen zeigte sich eine Steigerung der Aktivität von NF- κ B bei Melanomzellen bei oxidativen Streß, in diesem Fall Wasserstoffperoxid, im Gegensatz zu normalen Melanozyten. AP-1 dagegen, ein anderer Transkriptionsfaktor, zeigte ein umgekehrtes Verhalten. Als Reaktion auf Wasserstoffperoxid stieg die Aktivität bei normalen Melanozyten. Melanomzellen reagierten mit einem Abfall der Aktivität (Meyskens et al., 1999).

Weder die AP-1- noch die NF- κ B-Rekrutierung hatte aber einen Einfluß auf die Apoptose von Melanomzellen, was einen Zusammenhang mit der Fähigkeit des Tumors nahelegt, sich gegen oxidative Abwehrmechanismen des Körper zu schützen (Meyskens et al., 2001).

ICAM-1, ein Protein, welches mit der Tumorprogression und Metastasierung unter anderem von Melanomen, in Zusammenhang gebracht wird, wird ebenfalls beeinflusst von der oxidativen Balance der Zelle. Nicht nur Zytokine wie TNF oder verschiedene Interleukine, sondern auch oxidativer Streß bewirkt eine Erhöhung der Expression von ICAM-1 (Ikeda et al., 1994). Über die Produktion von ROS rekrutiert TNF Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B oder AP-1. Diese wiederum induzieren die Synthese von ICAM-1. Interessanterweise scheint TNF jedoch auch die Synthese von Mn-SOD und Cu/Zn-SOD in humanen Melanomzellen zu induzieren (Morandini et al., 1999). Hier scheinen antioxidative Enzyme die Induktion

bestimmter Moleküle, die beispielsweise in Zusammenhang mit Metastasierungsvorgängen stehen, zu modulieren.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen einen Zusammenhang zwischen oxidativem Streß, antioxidativem Netzwerk und Pathogenität des Melanoms nahe.

Hirose konnte weiterhin zeigen, daß eine Überexpression von Mn-SOD bei humanen Melanomzellen *in vitro* dazu führte, daß sich diese nach Exposition zu Strahlung und verschiedenen Zytostatika schneller und besser erholten als Melanomzellen, bei denen die Expression von Mn-SOD supprimiert wurde (Hirose et al., 1993). Dies könnte daraufhin deuten, daß der veränderte antioxidative Status einen Selektionsvorteil für die Melanomzellen darstellt.

Es konnte in der vorliegenden Arbeit eine signifikante Erhöhung des Lipidperoxidationsproduktes Malondialdehyd beim superfiziell spreitenden Melanom nachgewiesen werden. Der Anreicherung von MDA war hierbei nicht nur im Tumor selber, sondern auch in der Umgebungshaut des Tumors sehr deutlich zu sehen.

Picardo et al zeigten, daß Melanomzellen eine erhöhte Konzentration von ungesättigten Fettsäuren besitzen, was Lipidperoxidationsprozesse durch oxidativen Streß begünstigt (Picardo et al., 1996; Girotti, 2001).

Die Beeinträchtigung des umgebenden Zellgewebes erleichtert möglicherweise auch Wachstum und Metastasierung des Tumors (Bittinger et al., 1998; Meyskens et al., 2001).

MDA scheint das größte mutagene Potential verschiedener Lipidperoxidationsprodukte zu besitzen (Marnett, 1999b). Es reagiert u.a. mit Basen von Nukleinsäuren unter der Bildung verschiedener DNA-Addukte, wie zum Beispiel Pyrimidopurinone. Diese und auch andere entstehende DNA-Addukte bewirken unterschiedliche Veränderungen des genetischen Codes (Marnett, 1999a). Eine erhöhte Konzentration von Malondialdehyd könnte also ein Hinweis auf die Einbindung in mutagene Prozesse und somit der Karzinogenese sein. Da jedoch *in vitro* 4-Hydroxynonenal, ein weiteres wichtiges Lipidperoxidationsprodukt, eine Wachstumshemmung von Melanomzellen bewirkt (Zarkovic et al., 1995), könnte die erhöhte Konzentration von Malondialdehyd auch ein Hinweis auf die Einbindung von Lipidperoxidationsprodukten in physiologische Kontrollen des Tumorwachstums sein.

6.2. Epidermale Tumoren

Eine Beteiligung von UV-Strahlung an der Genese von epidermalen Hauttumoren konnte in vielen Arbeiten gezeigt werden (Black et al., 1997; de Gruijl et al., 2001). Es besteht eine deutliche Korrelation zwischen kumulativer Exposition zum Sonnenlicht und der Tumorentstehung. Auch die bevorzugten Lokalisationen epidermaler Tumoren in sonnenexponierten Arealen wie Gesicht, Nacken oder Handrücken weisen auf diesen Zusammenhang hin (Ley, 1995).

Die Rolle der UV-Strahlung wird betont durch die steigende Inzidenz des Basalzellkarzinoms (Harris et al., 2001). Auch für das spinözelluläre Karzinom wird eine steigende Inzidenz berichtet (Armstrong und Krickler, 2001). Hierbei spielt das veränderte Urlaubs- und Sonnenverhalten bei zunehmender Verminderung der Ozonschicht eine entscheidende Rolle (Corona et al., 2001).

Bekannt ist, daß UV-Strahlung das antioxidative Schutzsystem von Keratinozyten beeinflußt. Punnonen berichtet von signifikanter Verringerung der Aktivität der antioxidativen Enzyme Catalase und Cu/Zn-SOD bei humanen Keratinozyten in der Zellkultur nach UVA-Bestrahlung und nach PUVA-Behandlung (Psoralen + UVA) (Punnonen et al., 1991a). Derselbe Autor legt in einer anderen Arbeit jedoch zum Teil gegensätzliche Ergebnisse vor. Nach Bestrahlung der Haut von männlichen Probanden mit UV-Strahlung, die der doppelten MED (minimal erythema dose) entsprach, fand er die Aktivität von Cu/Zn-SOD signifikant verringert, die der Catalase aber deutlich erhöht (Punnonen et al., 1991b). Nach chronischer UVB-Bestrahlung war eine Induktion der epidermalen Superoxiddismutase *in vivo* festzustellen (Punnonen et al., 1995).

Rabilloud beschreibt eine Verminderung der Catalase-Aktivität in Zellkulturversuchen. Er fand unterschiedliche Catalase-Aktivitäten in verschiedenen humanen Keratinozyten-Zelllinien nach UV-Bestrahlung (Rabilloud et al., 1990).

In Tierversuchen mit Mäusen konnte Shindo demonstrieren, daß sich in der Haut nach Bestrahlung mit UVA und UVB eine Veränderung sowohl des enzymatischen als auch des nichtenzymatischen antioxidativen Schutzes ergibt. Nach Bestrahlung mit der zehnfachen MED zeigte sich eine deutliche Verringerung der Catalase- und SOD-Aktivität in der Dermis und Epidermis. Auch α -Tocopherol, Vitamin C und Ubiquinon waren reduziert. Glutathion zeigte im Gegensatz dazu einen leichten Anstieg (Shindo et al., 1993).

Diese Arbeiten zeigen, daß UVA und auch UVB das enzymatische wie das nichtenzymatische antioxidative System der Haut beeinflussen können.

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, daß Änderungen in der enzymatischen antioxidativen Kapazität epidermaler Tumoren stattfinden. Beim spinozellulären Karzinom zeigte sich im Vergleich zu junger Kontrollhaut eine deutliche Verminderung der Cu/Zn-SOD-Expression. Im Vergleich mit der Kontrolle wies die Umgebungshaut des Tumors sogar eine signifikant ausgeprägte Verminderung auf ($p < 0,01$). Ähnlich verhielt es sich mit dem Enzym Catalase. Eine deutliche Verminderung der Expression im Tumor stand einer noch stärkeren Verminderung in der Umgebungshaut des Tumors ($p < 0,05$) gegenüber. Interessanterweise war die Expression der Mn-SOD nur unwesentlich verändert. Hier fand sich im Gegensatz zu den anderen untersuchten Enzymen sowohl im Tumor wie auch in der Umgebungshaut eine sehr gering erhöhte Expression des Enzyms. Die aktinische Keratose als präkanzeröse Veränderung des spinozellulären Karzinoms wies dagegen eine geringe Verminderung der Expression der beiden Enzyme Cu/Zn-SOD und Catalase auf. Die Expression der Mn-SOD war jedoch im Vergleich zu junger, gesunder Haut, wie beim spinozellulären Karzinom, leicht erhöht. Auch das Basalzellkarzinom zeigte im Vergleich zur Kontrolle eine deutlich verringerte Expression der Cu/Zn-SOD. Wieder war die verminderte Expression in der Umgebungshaut stärker ausgeprägt ($p < 0,05$). Es bestand eine signifikante Minderung der Expression der Catalase ($p < 0,05$). Allerdings war hier kein Unterschied zwischen Tumorgewebe und Umgebungshaut des Tumors nachweisbar. Die Expression der Mn-SOD war sowohl im Tumorgewebe als auch in der Umgebungshaut des Basalzellkarzinoms leicht erhöht.

Es gibt bisher einige wenige Untersuchungen zu Antioxidantien bei epidermalen Hauttumoren. Bei der aktinischen Keratose und beim Basalzellkarzinom zeigten sich im Plasma signifikante Verringerungen von verschiedenen nichtenzymatischen Antioxidantien, wie z.B. Vitamin C, α -Tocopherol und Glutathion (Vural et al., 1999).

Kobayashi wies eine deutliche Verminderung der Expression sowohl für Cu/Zn-SOD als auch für Mn-SOD im spinozellulären Karzinom nach. Diese Ergebnisse zeigen klare Übereinstimmung mit den in der Arbeit vorgelegten Befunden. Beim Basalzellkarzinom dagegen fand er allerdings eine deutliche Intensivierung der Anfärbung für die Cu/Zn-SOD auf. Dabei zeigte sich eine diffuse Verteilung der Färbereiche. Es konnte keine Anfärbung der Mn-SOD festgestellt werden (Kobayashi et al., 1991). Auch Borello et al konnten eine Verminderung der Expression von Cu/Zn-SOD in Hautgewebeproben des spinozellulären Karzinoms zeigen. Im Basalzellkarzinom war die Enzymexpression unverändert (Borello et al., 1984). Bei Patienten mit oralem spinozellulärem Karzinom korrelierte die Prognose mit dem Gehalt an Mn-SOD im Tumorgewebe. Dabei zeigte sich die Veränderung der

Enzymaktivität in Form eines Anstiegs vor allem bei Patienten mit Lymphknoten–Metastasen (Kurokawa et al., 1998). Yigitbasi et al fanden eine Veränderung des antioxidativen Status beim spinözellulären Larynxkarzinom mit signifikanter Verminderung der Aktivität der Superoxiddismutase im Vergleich zu normalem Gewebe. Die Aktivität der Catalase war in dieser Untersuchung unverändert. Interessanterweise konnte auch keine Veränderung des Gehaltes an Malondialdehyd gefunden werden (Yigitbasi et al., 2000).

Die hier vorgestellten Ergebnisse stimmen also mit bisherigen Untersuchungen, besonders in Bezug auf das spinözelluläre Karzinom, weitgehend überein.

Kumulativer oxidativer Streß, wie bei chronischer UV-Belastung könnte das antioxidative System der Haut überfordern (Okada et al., 1994). Sander et al fanden ebenfalls eine Schädigung des enzymatischen antioxidativen Schutzes bei chronisch UV-geschädigter Haut (Sander et al., 2002).

Auch Lipidperoxidationsprozesse, angeregt durch UV-Strahlung, werden als entscheidender Faktor bei der Karzinogenese epidermaler Tumore erachtet (Punnonen et al., 1991b; Marnett, 1999a). Alle untersuchten epidermalen Hautveränderungen, einschließlich der aktinischen Keratose, zeigten einen Anstieg des Lipidperoxidationsproduktes Malondialdehyd, signifikant allerdings nur das spinözelluläre Karzinom.

Verschiedene Autoren bestätigen den Zusammenhang zwischen Lipidschädigung und chronischer UV-Exposition.

Nach UVA-Bestrahlung von humanen Keratinozyten in der Zellkultur fand Punnonen die Konzentration von Arachidonsäure erhöht. Gleichzeitig war die Aktivität von Catalase und Superoxiddismutase vermindert (Punnonen et al., 1991a). Auch bei anderen Versuchsreihen *in vivo* fand derselbe Autor die Konzentration von Lipidperoxidationsprodukten nach UV-Bestrahlung erhöht (Punnonen et al., 1991b).

Die Verringerung des antioxidativen Schutzes gegen Radikale erleichtert Lipidperoxidationsprozesse und begünstigt somit die Entstehung von Tumoren auf dem Boden von chronischer UV-Schädigung.

7. Schlußfolgerung

Die Verteilung und Expression von antioxidativen Enzymen, aber auch nichtenzymatischen Antioxidantien der Haut ist bei melanozytären und epidermalen Tumoren verändert. Das Zusammenspiel verschiedener Antioxidantien ist allerdings sehr komplex, so daß Änderungen in der Konzentration oder Aktivität einer Komponente das gesamte antioxidative System beeinflussen können (Thiele et al., 2001).

Diese Auslenkung des natürlichen Redoxgleichgewichtes könnte zu einer endogenen Entstehung von radikalen Sauerstoffspezies führen. Es konnte gezeigt werden, daß bei einigen Tumoren eine endogene Produktion von Sauerstoffradikalen zu finden ist. Humane Melanomzellen in Zellkultur produzieren große Mengen an Superoxidanion. Bittinger et al. vermuten hier einen Zusammenhang mit der Fähigkeit des Tumors, zu metastasieren (Bittinger et al., 1998).

Die erhöhte antioxidative Kapazität bei Melanomen, die in der Arbeit gezeigt werden konnte, könnte Melanomzellen vor gesteigerter eigener ROS-Produktion oder vor oxidativen Abwehrmechanismen des Körpers, z.B. dem „respiratory burst“ von Leukozyten, schützen.

Diese einzigartigen Eigenschaften von Melanomzellen *in vivo* könnten einen Selektionsvorteil der malignen Zellen darstellen.

Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse zeigen eine signifikante Erhöhung der Konzentration an Malondialdehyd beim superfiziell spreitenden Melanom. Dabei waren die Veränderungen nicht nur in Kernbereichen des Tumors, sondern auch in umgebenden Keratinozyten zu finden, was auf schwere oxidative Schäden in der Umgebung des Tumors deutet. Möglicherweise begünstigt die oxidative Schädigung der den Tumor umgebenden Zellmatrix auch Wachstum und Metastasierung des Tumors (Picardo et al., 1996; Bittinger et al., 1998; Meyskens et al., 2001).

Es konnte bereits gezeigt werden, daß Melanomzellen erhöhte Konzentrationen von ungesättigten Fettsäuren aufweisen (Picardo et al., 1996). Diese sind ein empfindliches Ziel von oxidativen Prozessen (Girotti, 2001).

Die verstärkte Imbalance des antioxidativen Netzwerks und die Fähigkeit, Superoxidanionen zu produzieren, könnten Lipidperoxidationsprozesse bei melanozytären Tumoren begünstigen.

Bei epidermalen Tumoren gibt es bis heute kaum systematische Untersuchungen zu antioxidativen Enzymen und Lipidperoxidationsprozessen *ex vivo*. Die überwiegende Zahl der

Studien beschäftigt sich mit Plasma- und Serumspiegeln von antioxidativen Substanzen. In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, daß Änderungen in der enzymatischen antioxidativen Kapazität epidermaler Tumoren stattfinden. Die Verminderung der antioxidativen Kapazität könnte durch chronische UV-Exposition verursacht werden. Sander et al zeigten kürzlich eine Verminderung antioxidativer Enzyme und erhöhter Proteinoxidation bei chronisch UV-geschädigter Haut (Sander et al., 2002).

Auch der Peroxidation von Lipiden durch UV-Strahlung wird immer mehr eine Schlüsselrolle bei der Karzinogenese zugewiesen (Punnonen et al., 1991b; Marnett, 1999a).

Die gesteigerte ROS-Bildung durch UV-Exposition könnte bei vermindertem antioxidativem Schutz zu ROS-induzierten DNA-Schäden führen und so in die Karzinogenese epidermaler Hauttumoren eingreifen. Brash wies UV-spezifische Veränderungen der DNA am p53-Tumorsuppressorgen bei Patienten mit spinözellulärem Karzinom nach (Brash et al., 1991).

Die verstärkte Auslenkung des antioxidativen Netzwerks mit Verminderung der antioxidativen Abschirmung gegen Radikale begünstigt Lipidperoxidationsprozesse und damit auch die Entstehung von Tumoren auf dem Boden chronisch lichtgeschädigter Haut.

All dies weist daraufhin, daß oxidativer Streß eine unterschiedliche Rolle in der Pathophysiologie von melanozytären und epidermalen Hauttumoren spielt. Die Verminderung der antioxidativen Kapazität epidermaler Tumoren könnte durch chronische UV-Exposition verursacht werden, ähnlich wie bei chronisch lichtgeschädigter Haut (Sander et al., 2002). Die durch UV-Strahlung verursachten Sauerstoffradikale können bei vermindertem antioxidativem Schutz zu Veränderungen der DNA führen und so die Karzinogenese epidermaler Hauttumoren begünstigen. Die Verringerung der Antioxidantien führt weiter zu Lipidperoxidationsprozessen. Die entstehenden Produkte, die zum Teil ein hohes karzinogenes Potential besitzen, fördern den Prozeß der Entartung.

Die erhöhte antioxidative Kapazität, die in der vorliegenden Arbeit in Melanomgewebe nachgewiesen werden konnte, könnte Melanomzellen vor oxidativen Abwehrmechanismen des Körpers, z.B. dem „respiratory burst“ von Leukozyten aber auch vor bekannter eigener ROS-Produktion schützen (Bittinger et al., 1998). Diese endogene Erzeugung von Radikalen, könnte verschiedene Prozesse, wie Tumorprogression oder Metastasierung, begünstigen.

Auch scheinen die antioxidativen Enzyme die Induktion bestimmter Moleküle, die beispielsweise in Zusammenhang mit Metastasierungsvorgängen stehen, zu beeinflussen. Die signifikante Erhöhung des Lipidperoxidationsmarkers Malondialdehyd (MDA) beim superfiziell spreitenden Melanom weist deutlich auf den bestehenden oxidativen Streß hin.

Deutlich ist also ein Zusammenhang zwischen oxidativem Streß, antioxidativem Netzwerk und Pathogenität des Melanoms festzustellen. Diese zuvor noch nicht beschriebenen Eigenschaften von Melanomzellen *in vivo* könnten einen Selektionsvorteil der malignen Zellen und damit einen weiteren Pathogenitätsfaktor des malignen Melanoms darstellen.

8. Literaturverzeichnis

1. Abe J, Okuda M, Huang Q, Yoshizumi M and Berk BC (2000) Reactive oxygen species activate p90 ribosomal S6 kinase via Fyn and Ras. *J Biol Chem* 275: 1739-1748.
2. Ames BN, Gold LS and Willett WC (1995) The causes and prevention of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 5258-5265.
3. Amstad P, Peskin A, Shah G, Mirault ME, Moret R, Zbinden I and Cerutti P (1991) The balance between Cu,Zn-superoxide dismutase and catalase affects the sensitivity of mouse epidermal cells to oxidative stress. *Biochemistry* 30: 9305-9313.
4. Applegate LA, Scaletta C, Labidi F, Vile GF and Frenk E (1996) Susceptibility of human melanoma cells to oxidative stress including UVA radiation. *Int J Cancer* 67: 430-434.
5. Armstrong BK (1988) Epidemiology of malignant melanoma: intermittent or total accumulated exposure to the sun? *J Dermatol Surg Oncol* 14: 835-849.
6. Armstrong BK and Krickler A (2001) The epidemiology of UV induced skin cancer. *J Photochem Photobiol B* 63: 8-18.
7. Arnaiz SL, Travacio M, Llesuy S and Boveris A (1995) Hydrogen peroxide metabolism during peroxisome proliferation by fenofibrate. *Biochim Biophys Acta* 1272: 175-180.
8. Bilu D: Basal_Cell_Carcinoma_2_030513.jpg. <http://www.DermAtlas.org>, Cohen, B.A. Lehmann, C.U. (2003).
9. Bittinger F, Gonzalez-Garcia JL, Klein CL, Brochhausen C, Offner F and Kirkpatrick CJ (1998) Production of superoxide by human malignant melanoma cells. *Melanoma Res* 8: 381-387.
10. Black HS, deGruijl FR, Forbes PD, Cleaver JE, Ananthaswamy HN, deFabo EC, Ullrich SE and Tyrrell RM (1997) Photocarcinogenesis: an overview. *J Photochem Photobiol B* 40: 29-47.
11. Blum A and Volkenandt M (2002) Skin cancer. *Dtsch Med Wochenschr* 127: 1679-1681
12. Borek C (1991) Free-radical processes in multistage carcinogenesis. *Free Radic Res Commun* 12-13: 745-750.
13. Borrello S, Seccia A, Galeotti T, Bartoli GM, Farallo E and Serri F (1984) Protective enzymes in human epidermal carcinomas and psoriasis. *Arch Dermatol Res* 276: 338-340

14. Brash DE, Rudolph JA, Simon JA, Lin A, McKenna GJ, Baden HP, Halperin AJ and Ponten J (1991) A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 10124-10128
15. Braun-Falco OP, G.; Wolff H.H.: *Dermatologie und Venerologie*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokio (1995) S. 832-902
16. Breen AP and Murphy JA (1995) Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic Biol Med* 18: 1033-1077.
17. Burdon RH (1995) Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radic Biol Med* 18: 775-794.
18. Burdon RH and Rice-Evans C (1989) Free radicals and the regulation of mammalian cell proliferation. *Free Radic Res Commun* 6: 345-358
19. Cerutti P, Shah G, Peskin A and Amstad P (1992) Oxidant carcinogenesis and antioxidant defense. *Ann N Y Acad Sci* 663: 158-166.
20. Cerutti P, Ghosh R, Oya Y and Amstad P (1994) The role of the cellular antioxidant defense in oxidant carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 102 Suppl 10: 123-129.
21. Chang H, Oehrl W, Elsner P and Thiele JJ (2003) The role of H₂O₂ as a mediator of UVB-induced apoptosis in keratinocytes. *Free Radic Res* 37: 655-663
22. Cockerell CJ (2000) Histopathology of incipient intraepidermal squamous cell carcinoma ("actinic keratosis"). *J Am Acad Dermatol* 42: 11-17.
23. Corona R, Dogliotti E, D'Errico M, Sera F, Iavarone I, Baliva G, Chinni LM, Gobello T, Mazzanti C, Puddu P and Pasquini P (2001) Risk factors for basal cell carcinoma in a Mediterranean population: role of recreational sun exposure early in life. *Arch Dermatol* 137: 1162-1168
24. Cribier B, Asch P and Grosshans E (1999) Differentiating squamous cell carcinoma from keratoacanthoma using histopathological criteria. Is it possible? A study of 296 cases. *Dermatology* 199: 208-212
25. Crowson AN, Magro CM, Sanchez-Carpintero I and Mihm MC, Jr. (2002) The precursors of malignant melanoma. *Recent Results Cancer Res* 160: 75-84
26. de Gruijl FR, van Kranen HJ and Mullenders LH (2001) UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer. *J Photochem Photobiol B* 63: 19-27.
27. Diepgen TL and Mahler V (2002) The epidemiology of skin cancer. *Br J Dermatol* 146 Suppl 61: 1-6.
28. Ekanayake Mudiyansele S, Hamburger M, Elsner P and Thiele JJ (2003) Ultraviolet a induces generation of squalene monohydroperoxide isomers in human sebum and skin surface lipids in vitro and in vivo. *J Invest Dermatol* 120: 915-922

29. Esterbauer H, Schaur RJ and Zollner H (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 11: 81-128
30. Fridovich I (1984) Overview: biological sources of O₂. *Methods Enzymol* 105: 59-61
31. Fridovich I (1998) Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exp Biol* 201: 1203-1209.
32. Fritsch P: *Dermatologie*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (2003) S. 521-527
33. Fuchs J, Huflejt ME, Rothfuss LM, Wilson DS, Carcamo G and Packer L (1989) Impairment of enzymic and nonenzymic antioxidants in skin by UVB irradiation. *J Invest Dermatol* 93: 769-773.
34. Garbe C and Orfanos CE (1989) [Epidemiology of malignant melanoma in West Germany in an international comparison]. *Onkologie* 12: 253-262
35. Girotti AW (2001) Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms. *J Photochem Photobiol B* 63: 103-113.
36. Gius D, Botero A, Shah S and Curry HA (1999) Intracellular oxidation/reduction status in the regulation of transcription factors NF-kappaB and AP-1. *Toxicol Lett* 106: 93-106.
37. Grammatico P, Maresca V, Roccella F, Roccella M, Biondo L, Catricala C and Picardo M (1998) Increased sensitivity to peroxidizing agents is correlated with an imbalance of antioxidants in normal melanocytes from melanoma patients. *Exp Dermatol* 7: 205-212.
38. Halliwell B (1989) Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Pathol* 70: 737-757.
39. Harris RB, Griffith K and Moon TE (2001) Trends in the incidence of nonmelanoma skin cancers in southeastern Arizona, 1985-1996. *J Am Acad Dermatol* 45: 528-536.
40. Hirose K, Longo DL, Oppenheim JJ and Matsushima K (1993) Overexpression of mitochondrial manganese superoxide dismutase promotes the survival of tumor cells exposed to interleukin-1, tumor necrosis factor, selected anticancer drugs, and ionizing radiation. *Faseb J* 7: 361-368.
41. Hunt CR, Sim JE, Sullivan SJ, Featherstone T, Golden W, Von Kapp-Herr C, Hock RA, Gomez RA, Parsian AJ and Spitz DR (1998) Genomic instability and catalase gene amplification induced by chronic exposure to oxidative stress.
42. Ikeda M, Schroeder KK, Mosher LB, Woods CW and Akeson AL (1994) Suppressive effect of antioxidants on intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 103: 791-796.
43. Jung EG und Moll I: *Dermatologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (2003) S. 193-252

44. Kanjilal S, Pierceall WE, Cummings KK, Kripke ML and Ananthaswamy HN (1993) High frequency of p53 mutations in ultraviolet radiation-induced murine skin tumors: evidence for strand bias and tumor heterogeneity. *Cancer Res* 53: 2961-2964.
45. Kaufmann R, Tilgen W and Garbe C (1998) [Malignant melanoma. Quality Assurance Committee of the German Society of Dermatology and the Professional Organization of German Dermatologists e. V.]. *Hautarzt* 48 Suppl 1: S30-38
46. Kitazawa M, Podda M, Thiele J, Traber MG, Iwasaki K, Sakamoto K and Packer L (1997) Interactions between vitamin E homologues and ascorbate free radicals in murine skin homogenates irradiated with ultraviolet light. *Photochem Photobiol* 65: 355-365.
47. Klann E, Roberson ED, Knapp LT and Sweatt JD (1998) A role for superoxide in protein kinase C activation and induction of long-term potentiation. *J Biol Chem* 273: 4516-4522.
48. Kobayashi T, Matsumoto M, Iizuka H, Suzuki K and Taniguchi N (1991) Superoxide dismutase in psoriasis, squamous cell carcinoma and basal cell epithelioma: an immunohistochemical study. *Br J Dermatol* 124: 555-559.
49. Koop DR (1992) Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 2E1. *Faseb J* 6: 724-730.
50. Kurokawa H, Sakimoto M, Yamashita Y, Murata T and Kajiyama M (1998) Manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) correlates with prognosis of patients with oral squamous cell carcinoma. *Fukuoka Igaku Zasshi* 89: 321-327.
51. Lambert WC and Lambert MW: DNA Repair Deficiency and Skin Cancer in Xeroderma Pigmentosum. In: Mukhtar H: Skin cancer : mechanisms and human relevance / edited by Hasan Mukhtar. CRC Press, Boca Raton (1995) S. 39-70
52. Le AD, Fenske NA, Glass LF and Messina JL (1997) Malignant melanoma: differential diagnosis of pigmented lesions. *J Fla Med Assoc* 84: 166-174.
53. Ley RD: Animal Models for Melanoma Skin Cancer. In: Mukhtar H: Skin cancer : mechanisms and human relevance / edited by Hasan Mukhtar. CRC Press, Boca Raton (1995) S. 9-12
54. Loft S and Poulsen HE (1996) Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J Mol Med* 74: 297-312.
55. Marnett LJ (1999a) Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res* 424: 83-95.
56. Marnett LJ (1999b) Chemistry and biology of DNA damage by malondialdehyde. *IARC Sci Publ* 150: 17-27
57. Marnett LJ (2000) Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21: 361-370.

58. Mates JM, Perez-Gomez C and Nunez de Castro I (1999) Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 32: 595-603.
59. Matsui MS and DeLeo VA: Photocarcinogenesis by Ultraviolet A and B. In: Mukhtar H: Skin cancer : mechanisms and human relevance / edited by Hasan Mukhtar. CRC Press, Boca Raton (1995) S. 21-30
60. Metcalf JS (1996) Melanoma: criteria for histological diagnosis and its reporting. *Semin Oncol* 23: 688-692.
61. Meyer M, Pahl HL and Baeuerle PA (1994) Regulation of the transcription factors NF-kappa B and AP-1 by redox changes. *Chem Biol Interact* 91: 91-100.
62. Meyskens FL, Jr., Chau HV, Tohidian N and Buckmeier J (1997) Luminol-enhanced chemiluminescent response of human melanocytes and melanoma cells to hydrogen peroxide stress. *Pigment Cell Res* 10: 184-189.
63. Meyskens FL, Jr., Buckmeier JA, McNulty SE and Tohidian NB (1999) Activation of nuclear factor-kappa B in human metastatic melanoma cells and the effect of oxidative stress. *Clin Cancer Res* 5: 1197-1202.
64. Meyskens FL, Jr., McNulty SE, Buckmeier JA, Tohidian NB, Spillane TJ, Kahlon RS and Gonzalez RI (2001) Aberrant redox regulation in human metastatic melanoma cells compared to normal melanocytes. *Free Radic Biol Med* 31: 799-808.
65. Miller SJ (1991) Biology of basal cell carcinoma (Part II). *J Am Acad Dermatol* 24: 161-175.
66. Morandini R, Boeynaems JM, Duhant X, Jacquemotte F, Kinnaert E and Ghanem G (1999) SODs are involved in the regulation of ICAM-1 expression in human melanoma and endothelial cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 45: 1053-1063.
67. Nguyen TH and Ho DQ (2002) Nonmelanoma skin cancer. *Curr Treat Options Oncol* 3: 193-203.
68. Ockner RK, Kaikaus RM and Bass NM (1993) Fatty-acid metabolism and the pathogenesis of hepatocellular carcinoma: review and hypothesis. *Hepatology* 18: 669-676.
69. Okada K, Takahashi Y, Ohnishi K, Ishikawa O and Miyachi Y (1994) Time-dependent effect of chronic UV irradiation on superoxide dismutase and catalase activity in hairless mice skin. *J Dermatol Sci* 8: 183-186
70. Olinski R, Jaruga P and Zastawny TH (1998) Oxidative DNA base modifications as factors in carcinogenesis. *Acta Biochim Pol* 45: 561-572
71. Perchellet J-P, Perchellet Elisabeth M., Gali Hala U., Xiao Mei Gao: Oxidant Stress and Multistage Skin Carcinogenesis. In: Mukhtar H: Skin cancer : mechanisms and human relevance / edited by Hasan Mukhtar. CRC Press, Boca Raton (1995) S. 145-180

72. Picardo M, Grammatico P, Roccella F, Roccella M, Grandinetti M, Del Porto G and Passi S (1996) Imbalance in the antioxidant pool in melanoma cells and normal melanocytes from patients with melanoma. *J Invest Dermatol* 107: 322-326.
73. Punnonen K, Jansen CT, Puntala A and Ahotupa M (1991a) Effects of in vitro UVA irradiation and PUVA treatment on membrane fatty acids and activities of antioxidant enzymes in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 96: 255-259.
74. Punnonen K, Autio P, Kiistala U and Ahotupa M (1991b) In-vivo effects of solar-simulated ultraviolet irradiation on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in human epidermis. *Br J Dermatol* 125: 18-20.
75. Punnonen K, Lehtola K, Autio P, Kiistala U and Ahotupa M (1995) Chronic UVB irradiation induces superoxide dismutase activity in human epidermis in vivo. *J Photochem Photobiol B* 30: 43-48.
76. Quinn AG, Sikkink S and Rees JL (1994) Basal cell carcinomas and squamous cell carcinomas of human skin show distinct patterns of chromosome loss. *Cancer Res* 54: 4756-4759.
77. Rabilloud T, Asselineau D, Miquel C, Calvayrac R, Darmon M and Vuillaume M (1990) Deficiency in catalase activity correlates with the appearance of tumor phenotype in human keratinocytes. *Int J Cancer* 45: 952-956.
78. Sander CS, Chang H, Hamm F, Elsner P and Thiele JJ (2004) Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis. *Int J Dermatol* 43: 326-335
79. Sander CS, Chang H, Salzmann S, Muller CS, Ekanayake-Mudiyanselage S, Elsner P and Thiele JJ (2002) Photoaging is associated with protein oxidation in human skin in vivo. *J Invest Dermatol* 118: 618-625.
80. Schadendorf D, Zuberbier T, Diehl S, Schadendorf C and Czarnetzki BM (1995) Serum manganese superoxide dismutase is a new tumour marker for malignant melanoma. *Melanoma Res* 5: 351-353.
81. Shindo Y, Witt E and Packer L (1993) Antioxidant defense mechanisms in murine epidermis and dermis and their responses to ultraviolet light. *J Invest Dermatol* 100: 260-265.
82. Sies H (1997) Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 82: 291-295.
83. Slater TF (1984) Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 222: 1-15.
84. Stevens A: Clinical dermatopathology. a text and colour atlas. Churchill Livingstone, Edinburgh (1989) S. 125-151
85. Thiele JJ, Traber MG and Packer L (1998) Depletion of human stratum corneum vitamin E: an early and sensitive in vivo marker of UV induced photo-oxidation. *J Invest Dermatol* 110: 756-761

86. Thiele JJ, Schroeter C, Hsieh SN, Podda M and Packer L (2001) The antioxidant network of the stratum corneum. *Curr Probl Dermatol* 29: 26-42
87. Toyokuni S (1999) Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathol Int* 49: 91-102.
88. Visner GA, Dougall WC, Wilson JM, Burr IA and Nick HS (1990) Regulation of manganese superoxide dismutase by lipopolysaccharide, interleukin-1, and tumor necrosis factor. Role in the acute inflammatory response. *J Biol Chem* 265: 2856-2864.
89. Vural P, Canbaz M and Selcuki D (1999) Plasma antioxidant defense in actinic keratosis and basal cell carcinoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 13: 96-101.
90. Weber SU, Thiele JJ, Cross CE and Packer L (1999) Vitamin C, uric acid, and glutathione gradients in murine stratum corneum and their susceptibility to ozone exposure. *J Invest Dermatol* 113: 1128-1132.
91. Weiss J, Garbe C, Bertz J, Biltz H, Burg G, Hennes B, Jung EG, Kreysel HW, Orfanos CE, Petzold D and et al. (1990) [Risk factors for the development of malignant melanoma in West Germany. Results of a multicenter-case control study]. *Hautarzt* 41: 309-313
92. Wong GH, Elwell JH, Oberley LW and Goeddel DV (1989) Manganous superoxide dismutase is essential for cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor. *Cell* 58: 923-931.
93. Yigitbasi OG, Guney E, Haghighi N, Dogan P, Saraymen R and Balkanli S (2000) Oxidant and antioxidant status in larynx squamous cell carcinomas. *J Exp Clin Cancer Res* 19: 447-451.
94. Yohn JJ, Norris DA, Yrastorza DG, Buno IJ, Leff JA, Hake SS and Repine JE (1991) Disparate antioxidant enzyme activities in cultured human cutaneous fibroblasts, keratinocytes, and melanocytes. *J Invest Dermatol* 97: 405-409.
95. Zamzami N, Hirsch T, Dallaporta B, Petit PX and Kroemer G (1997) Mitochondrial implication in accidental and programmed cell death: apoptosis and necrosis. *J Bioenerg Biomembr* 29: 185-193.
96. Zarkovic N, Tillian MH, Schaur J, Waeg G, Jurin M and Esterbauer H (1995) Inhibition of melanoma B16-F10 growth by lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *Cancer Biother* 10: 153-156.

9. Anhang

9.1. Danksagung

Ich möchte mich für die hervorragende Unterstützung bedanken, die ich von allen erfahren habe, die am Entstehen dieser Arbeit beteiligt waren.

Meiner Familie danke ich aus tiefem Herzen für ihre große Anteilnahme und jederzeitige selbstverständliche Hilfe. Ihre Unterstützung ermöglichte es mir, mich dieser Arbeit mit meiner ganzen Aufmerksamkeit und einem großen zeitlichen Aufwand widmen zu können.

Herrn Prof. Dr. Peter Elsner danke ich für die Überlassung des Themas sowie für die hilfreiche und freundliche Unterstützung.

Mein Dank gilt Herrn PD Dr. Jens Thiele. Er wies mich in die Thematik ein und betreute die Durchführung der Experimente.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Christina Sander, die mich mit viel Engagement und Motivation in allen Fragen unterstützte. Ihr danke ich auch für Hilfe und Unterstützung bei der Auswertung und Präsentation dieser Arbeit.

Weiterhin gilt mein Dank Frau Dr. Cornelia Müller, die immer ein offenes Ohr für mich hatte und deren Ratschläge mir stets weiterhalfen.

9.2. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich- Schiller- Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes unterstützt haben: Herr Prof. Dr. med. Peter Elsner, Herr PD Dr. med. Jens Thiele, Frau Dr. med. Christina Sander, Frau Dr. rer. nat. U.-Ch. Hipler und Frau Sabine Feldrappe,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und daß Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

daß ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

daß ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 5.9.04

9.3. Lebenslauf

Name	Florian Peter Hamm
Geburtsdatum	11.04.1975
Geburtsort	Weingarten
Familienstand	ledig
Nationalität	deutsch

Schulausbildung

1981 – 1985	Van-Gogh-Grundschule Duisburg-Rheinhausen
1985 – 1994	Steinbart-Gymnasium Duisburg
1994	Abitur

Ausbildung

1994 - 1996	Ausbildung zum Biologisch-Technisch-Assistenten an der Lessing Kollegscheule Düsseldorf
-------------	-----------------------------------------------------------------------------------------

Studium

1996 – 1997	Studium der Chemie an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
10/1997	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
09/1999	Ärztliche Vorprüfung
08/2000	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (FSU Jena)
04/2003	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (FSU Jena)
04/2003 – 03/2004	Praktisches Jahr
04/2003 - 08/2003	Klinik für Innere Medizin, Friedrich-Schiller-Universität Jena
08/2003 - 11/2003	Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und spezielle Schmerztherapie, Sophien- und Hufeland-Klinikum, Weimar
12/2003 - 03/2004	Abteilung für Chirurgie, Hospital Regional Diego Paroissien, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentinien
23.06.2004	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (FSU Jena)

Wissenschaftliche Arbeit

Seit Oktober 2000 Dissertation „Oxidativer Streß als pathophysiologischer Faktor aktinischer Dermatosen – Beeinträchtigung enzymatischer Antioxidantien und Anreicherung von Lipidperoxidationsprodukten bei UV-assoziierten Hauttumoren“ in der Forschungsgruppe „Experimentelle Photodermatologie“ unter Leitung von PD Dr. med. Jens Thiele, Klinik für Dermatologie und dermatologische Allergologie, Klinikum der FSU Jena

05/2003 „Oxidative stress in malignant melanoma and non-melanoma skin cancer“; Sander CS, Hamm F, Elsner P, Thiele JJ; Br J Dermatol. 2003 May;148(5):913-22

05/2004 „Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis“; Sander CS, Chang H, Hamm F, Elsner P, Thiele JJ; Int J Dermatol. 2004 May;43(5):326-35

Jena, den 05.09.04